



CATÓLICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

Preparação e caracterização de *scaffolds* de colagénio-nanohidroxiapatite modificados com *O-phospho-L-serine* para a regeneração tecidual óssea

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa

Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Beatriz Isabel Brites Teixeira

Viseu, 2016



CATÓLICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

LISBOA · PORTO · VISEU

Preparação e caracterização de *scaffolds* de colagénio-nanohidroxiapatite modificados com *O-phospho-L-serine* para a regeneração tecidual óssea

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa

Para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Orientador: Professor Doutora Christiane Salgado

Co-Orientador: Doutor Filipe Araújo

Por:

Beatriz Isabel Brites Teixeira

Viseu, 2016

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants”

Sir Isaac Newton

Resumo

O tecido ósseo é constantemente submetido a processos dinâmicos e fisiológicos inerentes à reabsorção e à formação óssea, de modo a garantir a integridade do esqueleto. Na maioria dos casos, o processo de reparação óssea é desencadeado pela fragilidade ou fratura do osso, como por exemplo em caso de defeitos de grandes dimensões. Porém, o processo de reparação nem sempre ocorre de forma ideal. Neste sentido, novas estratégias terapêuticas coadjuvantes ao processo de reparação óssea tem vindo a ser exaustivamente estudadas pela Engenharia de Tecidos. Atualmente, alguns biomateriais ou materiais biomiméticos tem vindo a ser utilizados na prática clínica em substituição dos enxertos autólogos reconhecidos como *gold standard*. A variedade destes materiais tem vindo a propiciar, progressivamente, o sucesso de tratamento. Contudo, o material ideal para a regeneração óssea requer ainda mais investigação. Este material deve ter propriedades similares ao osso natural como osteointegração, osteoindução e osteogénese. O objetivo desta dissertação consiste em reportar as propriedades físico-químicas e mecânicas dos *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite modificados com *O-phospho-L-serine* (fosfoserina), obtidos através do método de criogelação, como potenciais substitutos ósseos. A análise da morfologia e da superfície dos biocompósitos foi realizada utilizando a Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) e os resultados mostraram que os criogéis produzidos apresentam uma estrutura altamente porosa com a presença de cristais nanométricos de hidroxiapatite. De acordo com a análise química resultante da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), os picos de colagénio e hidroxiapatite nos *scaffolds* biocompósitos coincidem com os valores reportados na literatura e a fosfoserina não interfere com a ligação formada pelas moléculas de colagénio e os agregados de hidroxiapatite. O resultado do teste de absorção de solventes revela que diferentes concentrações do aminoácido em estudo têm influência da captação de água, isto é, os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com maior concentração de fosfoserina apresentam maior captação de água comparativamente às amostras com menor concentração de aminoácido. Por outro lado, quando as amostras são emergidas em PBS (tampão salino), os *scaffolds* com fosfoserina mostram menor

coeficiente de absorção. Por fim, segundo a análise dinâmico-mecânica, as amostras com fosfoserina apresentam uma redução das propriedades mecânicas, mas não significativamente, enquanto as propriedades viscoelásticas apresentam alteração, revelando deformação da amostra. Os resultados deste estudo permitem concluir que os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina apresentam propriedades físico-químicas e mecânicas propícias a estudos *in vitro* com culturas celulares.

Palavras-chave: *scaffolds*, colagénio, criogelação, regeneração óssea, fosfoserina;

Abstract

In order to maintain a healthy skeleton, bone tissue is constantly subjected to dynamic and physiological processes of reabsorption and new bone formation. Usually, the process of bone healing is triggered in some cases of tissue fragility or tissue damaged like e.g. large defects. In other way, sometimes the healing process does not respond appropriately. Fortunately, bone tissue engineering offers new therapeutic strategies to aid in the musculoskeletal healing. The development and use of biomaterials or biomimetic materials that can replace autologous grafts, recognized as *gold standard*, are often used today in daily clinical practice. Besides increased the range of choice, these biomaterials also have improved the clinical treatment. Nonetheless, the ideal material for bone regeneration requires further investigation. This material must have the same characteristics that we find in the native bone such osteointegration, osteoinduction and osteogenesis properties.

This dissertation try to investigate and expose the physicochemical and mechanical properties of collagen/nano-hydroxyapatite biocomposites scaffolds modified with O-phospho-L-serine (phosphoserine), obtained by cryogelation method, as potential bone substitutes. Morphology and surface analysis was performed using Scanning Eletron Microscope (SEM) and revealed that all cryogel scaffolds had highly porous structure with interconnective porosity with the presence of nanometric crystals of hydroxyapatite. According to the chemical analysis through Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), the peaks of collagen and hydroxyapatite in the biocomposite scaffolds are coincident with the values reported in the literature and the phosphoserine do not interfere with the link between collagen molecules and hydroxyapatite aggregates. The swelling tests has been shown that different concentrations of the aminoacid in study, have influence in water uptake, i.e., collagen/nano-hydroxyapatite biocomposites scaffolds with high content of phosphoserine display higher water uptake than low phosphoserine content. On the other hand, when the samples are in PBS (phosphate buffer), the samples with phosphoserine show lower degree of swelling behavior. Finally, in agreement with Dynamic Mechanical Analysis (DMA), the samples with phosphoserine show lower mechanical properties, but no significantly, even as visco-elastic properties have changed and reveals samples deformation. The results of this

investigation allow to assert that collagen/nano-hydroxyapatite biocomposite scaffolds modified with phosphoserine exhibit advantageous physicochemical and mechanical properties for *in vitro* studies.

Key-words: scaffolds, collagen, cryogelation, bone regeneration, phosphoserine

Agradecimentos

Agradeço, em especial, ao Professor Fernando Jorge Monteiro pelo voto de confiança e premissa durante o desenvolvimento deste projeto no laboratório por ele dirigido, sediado no I3S (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde). Agradeço também ao Ricardo Vidal do INEB pela assistência técnica do FT-IR e ao Rui Rocha da CEMUP pelo suporte técnico na SEM e ainda, à Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT-FCT-UID/BIM/04293/2013) pelo financiamento do projeto.

À minha orientadora Professora Christiane Salgado e ao meu co-orientador Dr. Filipe Araújo por todo o suporte científico e incentivo à união da Ciência com a Medicina Dentária, o meu muito obrigada!

Aos meus pais por todo o apoio, suporte, confiança e orgulho. Pelo esforço em proporcionar todas as condições necessárias durante o meu percurso académico. A vocês, muito obrigada!

Ao meu irmão que me ensinou que sozinhos fazemos muito, mas juntos fazemos mais. Por ser a inspiração e a elucidação necessária neste mundo em constante mudança. A ti, meu pilar, obrigada!

À minha amiga e “colega de casa” Marta Nobre, por todo o apoio, ajuda profissional e pessoal, amizade, confiança, inspiração e alegria. A ti, Obrigada!

Ao meu amigo Johnny Leite, por acreditar em mim, enquanto Biomédica e futura Médica Dentista, jamais esquecerei a amizade e a humildade. A distância não significa nada quando alguém significa muito. A ti, obrigada!

Às minhas amigas, Lilianny Dinis e Ana Herdade por toda a amizade, confiança e lealdade ao longo dos últimos anos académicos.

À Marta Inês e ao Luís Clemente pela amizade tipo “Fénix”, pela paciência, ajuda profissional e emocional. Por todos os sorrisos que partilhamos, obrigada!

Ao meu binómio André Rebolo, por estar sempre comigo, mesmo longe. Por tudo o que partilhamos e por todos os sorrisos que juntos criámos. Por toda a tranquilidade e paz que fez chegar até mim mesmo em dias tempestivos.

A ti, obrigada!

Índice

Resumo	VII
Abstract	IX
Agradecimentos	XI
Índice de tabelas	XV
Índice de figuras	XVII
Lista de abreviaturas	XIX
Introdução	3
1. Função	4
2. Estrutura	5
2.1. Componentes celulares	6
2.2 Matriz Extracelular	7
3. Remodelação/reparação óssea	12
4. Tratamento de defeitos ósseos	13
5. Medicina Regenerativa- Engenharia de tecidos	15
5.1 Scaffolds	16
5.1.1 Métodos de produção	17
5.1.2. Criogelação	18
5.1.2.1 Criogéis- Propriedades e aplicações	20
Materiais e métodos	25
1. Materiais	25
2. Preparação dos criogéis de colagénio e nano-hidroxiapatite com fosfoserina	25
3. Caracterização dos criogéis	26
Resultados	31
1. Morfologia dos materiais analisados por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)	31
2. Análise das ligações químicas dos materiais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	33
3. Propriedades de absorção de solventes (<i>swelling</i>)	34

4. Análise Dinâmico-Mecânica dos materiais (<i>DMA</i>)	35
Discussão	39
Conclusão	49
Perspetivas futuras.....	53
BIBLIOGRAFIA	57

Índice de tabelas

Tabela 1 Resultados da média, poro de maior e menor diâmetro (μm) dos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1), colagénio/nano-hidroxiapatite com 5 mg de fosfoserina (amostra 2) e colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoserina (amostra 3)..... 32

Tabela 2 Ratio de absorção das amostras de scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra1), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina 5mg (Amostra 2), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite 1 mg (Amostra 3)..... 35

Índice de figuras

Figura 1 Organização estrutural do tecido ósseo: 1) osso cortical e esponjoso; 2) ósteons com sistema de Havers; 3) lamelas; 4) fibras de colagénio formadas por fibrilas de colagénio; 5) cristais ósseos minerais, moléculas de colagénio e proteínas não colagenosas.	4
Figura 2 Representação esquemática da estrutura óssea (níveis macro-, micro- e nanoestrutural).	6
Figura 3 Estratégias utilizadas em Medicina Regenerativa.	15
Figura 4 Representação esquemática da técnica de criogelação.	18
Figura 5 Imagens obtidas por Microscopia Eletrónica de Varrimento das amostras seccionadas de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1), colagénio/nano-hidroxiapatite com 5 mg de fosfoserina (amostra 2) e colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoserina (amostra 3). Ampliação: x 200.	31
Figura 6 Distribuição da dimensão dos poros presentes nos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite modificados ou não com fosfoserina.	33
Figura 7 Espectro do FTIR relativo aos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra 1), aos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina 5 mg (Amostra 2) e 1 mg (Amostra 3).	34
Tabela 2 Ratio de absorção das amostras de scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra1), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina 5mg (Amostra 2), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite 1 mg (Amostra 3).....	35
Figura 8 Módulo de armazenamento E' (A) e Loss factor – Tan δ (B) sob compressão dinâmica <i>versus</i> aumento de frequência, variação de 0,1 a 10Hz.	36

Lista de abreviaturas

B

BMP's- proteínas ósseas morfogénicas

BSP- Sialoproteína óssea

D

DDP- fosforina dentária

DMA- Análise mecânico-dinâmica

E

EDC- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

F

FT-IR- Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

H

HA- hidroxiapatite

N

NHS- e N-hidroxisuccinamida

O

OPN- Osteopontina

P

PBS- Solução tampão salina

PG's- proteoglicanos

PTH- Hormona paratiroidea

S

SEM- Microscopia eletrónica por varrimento

V

VEGEF's- Fatores de crescimento vascular endotelial

Introdução

O osso é um tecido vivo altamente vascularizado e dinâmico que apresenta um papel fundamental na remodelação tecidual contínua durante o desenvolvimento e homeostasia através dos mecanismos fisiológicos de remodelação/reparação óssea autossustentadas.^(1, 2) Devido a estas características únicas, ao longo de décadas a engenharia de tecidos tem vindo a desenvolver novas estratégias para a produção de materiais com propriedades (comportamento mecânico e estrutural) e funções similares aos processos que decorrem no tecido ósseo natural.^(3, 4)

A estrutura do tecido ósseo influencia diretamente as funções que o osso executa nomeadamente suporte, proteção e armazenamento de cálcio.⁽⁵⁾ Deste modo, classificar o nível organizacional quanto à estrutura do tecido ósseo, é de extrema importância na tentativa de elucidar, por exemplo, como as células produzem toda esta estrutura tão complexa, quais os aspetos estruturais responsáveis pelas diferentes funções mecânicas e metabólicas e de que modo as alterações, sejam elas patológicas ou fisiológicas, afetam a função mecânica.^(3, 6) Assim, os níveis estruturais são (*Figura 1*):

1. Nível macroestrutural: o osso cortical e o osso esponjoso;
2. Nível microestrutural (10-500 μ m): o sistema de *Havers*, ósteons e osso trabeculado simples;
3. Nível sub-microestrutural (1-10 μ m): *Lamellae* (lamelas ósseas);
4. Nível nano-estrutural (± 100 nm - 1 μ m): as fibrilas de colagénio incorporadas em material mineral; Nível sub-nanoestrutural (< 100nm): a

estrutura molecular dos elementos constituintes como o colagénio, minerais e proteínas não colagenosas.

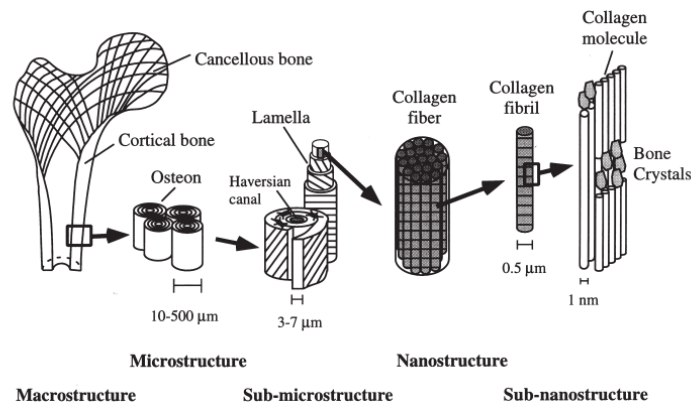


Figura 1 Organização estrutural do tecido ósseo: 1) osso cortical e esponjoso; 2) ósteons com sistema de Havers; 3) lamelas; 4) fibras de colagénio formadas por fibrilas de colagénio; 5) cristais ósseos minerais, moléculas de colagénio e proteínas não colagenosas. ⁽⁶⁾

1. Função

Os ossos que constituem o esqueleto humano conferem suporte estrutural para o resto do corpo permitindo o movimento muscular, a proteção dos órgãos internos como o cérebro e a medula óssea bem como outras estruturas nobres. O tecido ósseo, para além destas funções básicas de conhecimento comum, promove também a manutenção da homeostasia mineral, o equilíbrio ácido-base, constitui um reservatório para citocinas e fatores de crescimento bem como proporciona as condições necessárias para que ocorra a hematopoiese nos espaços medulares presentes na sua estrutura. ^(1, 7, 8)

O corpo humano é constituído por 206 ossos (no caso de adultos) e cada osso adapta-se a uma dada função específica, e por isso mesmo, apresentam diferenças quanto ao tamanho, forma e composição.⁽⁹⁾ Apesar da aparência como um tecido inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico que sofre reabsorção constante devido à atividade dos osteoclastos e formação de novo tecido pelos osteoblastos.⁽¹⁰⁾ Assim, cada osso sofre remodelação constante ao longo da vida para se adaptar às alterações provocadas pelas forças

biomecânicas e para remover os pequenos danos que ocorrem fisiológica ou patologicamente, substituindo o tecido lesado através da formação de novo tecido ósseo com iguais propriedades mecânicas ao tecido original de modo a preservar a resistência óssea inerente ao osso em questão.^(7, 11)

2. Estrutura

O osso é um tecido mineralizado altamente organizado e vascularizado conectado com vasos sanguíneos e células ósseas promovendo a integridade esquelética.^(12, 13) A nível embriológico, o tecido ósseo desenvolve-se a partir de dois processos distintos: ossificação intramembranosa (diferenciação direta das células mesenquimatosas em osteoblastos) ou ossificação endocondral (células mesenquimatosas diferencia-se em condrócitos para inicialmente formar uma matriz cartilaginosa que será progressivamente substituída por matriz óssea).⁽²⁾ A nível macroestrutural, o osso pode ser dividido em duas partes: osso cortical e osso trabecular. Cerca de 80% da totalidade óssea corresponde ao osso cortical enquanto o osso trabecular corresponde a 20%. O osso cortical é altamente calcificado e confere a proteção e a estrutura necessárias bem como define o espaço medular enquanto o osso trabecular corresponde a uma rede de trabéculas que se inserem em pequenos espaços no compartimento medular.⁽⁸⁾ Tipicamente, o osso cortical apresenta menor atividade metabólica relativamente ao osso trabecular e apresenta porosidade inferior a 5%.^(7, 14) Sucintamente, o osso cortical corresponde a repetidas unidades de ósteons, enquanto o tecido trabecular corresponde a uma rede de interligação de trabéculas com espaços livres da cavidade medular. Estas porções trabeculadas e ósteons são constituídos por fibras de colagénio que estão dispostas em períodos de 67 nm e espaços de 40nm entre as moléculas deste polímero natural (*Figura 2*). Este espaço permite a penetração de cristais de fosfato de cálcio e, conseqüentemente, o aumento da rigidez óssea.^(15, 16) Por fim, a irrigação sanguínea e a condução nervosa do tecido ósseo ocorre devido à presença de vasos sanguíneos, nervos e células ósseas acoplados ao perióstio (membrana de tecido fibroso presente na superfície externa ao osso cortical) e ao endóstio (membrana de superfície interna presente no osso cortical e trabecular).⁽⁷⁾

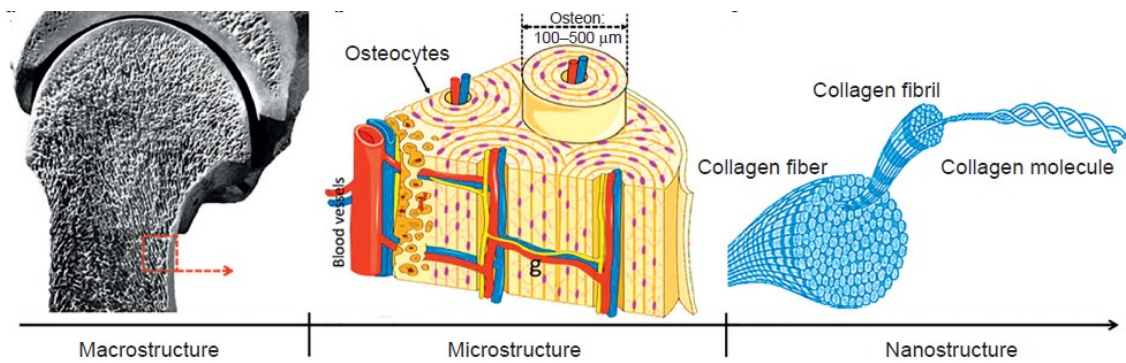


Figura 2 Representação esquemática da estrutura óssea (níveis macro-, micro- e nanoestrutural).⁽¹⁴⁾

2.1. Componentes celulares

O tecido ósseo é essencialmente constituído por três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Estes tipos celulares advêm de duas linhas celulares distintas: os osteoclastos surgem das células estaminais da medula óssea enquanto os osteoblastos estão relacionados com as células estaminais mesenquimatosas. Relativamente aos osteócitos, acredita-se que a sua origem está relacionada com a maturação dos osteoblastos.^(5, 10)

2.1.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são células grandes e cubóides que tem a sua origem nas células mesenquimatosas e apresentam uma linha celular comum com condrócitos, mioblastos, fibroblastos e adipócitos.^(7, 8, 10) Estão situados na superfície óssea e são responsáveis pela síntese de proteínas colagenosas e não-colagenosas e pela mineralização da matriz celular. Para além disso, expressam genes responsáveis pela síntese da fosfatase alcalina, do colagénio tipo I, das proteínas osteocalcina, osteonectina, osteopontina e uma vasta variedade de citocinas e fatores de crescimento com mecanismo não explícito.⁽⁵⁾ A diferenciação dos osteoblastos é dependente do *Runx2* - fator de transcrição importante na diferenciação das células mesenquimatosas em osteoblastos - e da presença de *BMP's* (proteínas ósseas morfogénicas) como fatores importantes na regulação da formação deste tipo celular bem como na formação da matriz óssea.^(5, 8)

2.1.2 Osteócitos

Os osteócitos correspondem a 90% das células ósseas.⁽⁵⁾ Derivam das células mesenquimatosas através da diferenciação dos osteoblastos em quatro fases distintas: osteóide-osteócito, pré-osteócito, osteócito imaturo e osteócito. No final deste processo, uma subpopulação de osteoblastos diferencia-se em osteócitos e é incorporada na matriz óssea. Este tipo celular está localizado maioritariamente nas lacunas da matriz mineralizada onde apresentam uma morfologia alongada no osso cortical e circular no osso trabecular.⁽¹⁰⁾ Relativamente à síntese de proteínas, os osteócitos não expressam a fosfatase alcalina como os osteoblastos mas expressam proteínas como osteocalcina, galectina 3, CD44 e recetores celulares para o hialuronato.⁽⁷⁾

2.1.3 Osteoclastos

Os osteoclastos têm origem nas células progenitoras mesenquimatosas num processo designado de osteoclastogénese e são regulados pela linha celular dos osteoblastos. Estas células multinucleadas diferenciadas são responsáveis pela reabsorção óssea, isto é, expressam recetores de calcitonina e produzem fosfatase ácida que induz a erosão das superfícies mineralizadas. Ainda assim, é uma célula de curta duração que após exercer a sua função é inativada e sofre apoptose celular.^(5, 7, 17) Um aumento anormal na atividade osteoclástica está presente em algumas patologias ósseas como a osteoporose. A osteoporose caracteriza-se por ser um processo patológico em que a taxa de reabsorção óssea excede a taxa de formação óssea causando um decréscimo na densidade óssea e aumento na possibilidade de fratura.⁽¹⁰⁾

2.2 Matriz Extracelular

As células dos tecidos que constituem corpo humano são suportadas por uma matriz extracelular. Esta corresponde a uma rede dinâmica de moléculas reconhecidas que formam uma complexa mistura de proteínas, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e pequenas moléculas que uma vez secretadas pelas células presentes fazem desta um componente tecidular altamente organizado. Para além disso, as propriedades bioquímicas e biofísicas da matriz extracelular são responsáveis pela integridade, migração, adesão, nutrição e diferenciação das células individuais.⁽¹⁸⁾

O metabolismo da matriz extracelular tem um papel preponderante no desenvolvimento dos tecidos esqueléticos nomeadamente em processos como crescimento de tecido, cicatrização de feridas, fibrose e invasão tumoral. Assume ainda grande importância na reparação/regeneração em situações de doenças que afetam o tecido ósseo ou trauma como fraturas ósseas, osteotomia, artrite e deformidades congénitas, pois os componentes da matriz extracelular formam um *scaffold* natural (matriz temporária, tecido de granulação e cicatriz) fornecendo a integridade estrutural necessária durante o processo de cicatrização.^(18, 19) A matriz óssea é constituída aproximadamente por cerca de 35% de material orgânico e 65% de material inorgânico. O material orgânico consiste fundamentalmente em colagénio, proteoglicanos e proteínas não colagenosas e o material inorgânico consiste principalmente em cristais de fosfato de cálcio denominados por hidroxiapatite. O colagénio e os componentes minerais são responsáveis pelas principais características funcionais do tecido ósseo pelo que serão descritos de seguida.⁽²⁰⁾

2.2.1 Colagénio

O colagénio representa 30% do total das proteínas presentes no corpo, é sintetizado e secretado maioritariamente na matriz extracelular pelos fibroblastos mas também é sintetizado por proteínas não colagenosas como a osteocalcina, a osteopontina e as sialo-proteínas ósseas. Atualmente são conhecidos 28 tipos de colagénio, no entanto, o colagénio tipo I é maioritariamente encontrado na matriz extracelular, especialmente em tecidos como nos tendões e no tecido ósseo.⁽²¹⁻²³⁾ Na maior parte dos tecidos as fibrilas de colagénio tipo I e tipo II (maioritariamente presente na cartilagem) são os constituintes *major* da matriz extracelular. Estas fibrilas estão associadas com outros tipo de colagénio, proteínas intrínsecas e *PGs* (proteoglicanos) de modo a produzir grandes estruturas fibrilares. Todos estes componentes estão conectados com moléculas associadas à matriz extracelular, que em comunicação com outros componentes proteicos e celulares, formam uma matriz complexa tridimensional.⁽²⁴⁾

No que se refere quanto à sua estrutura a nível molecular, corresponde a múltiplas repetições da sequência *Gly-X-Y* e uma hélice tripla única constituída por três cadeias polipeptídicas. No entanto, existem cerca de 42 cadeias diferentes identificadas que são descodificadas por 41 genes específicos o que

permite obter os 28 tipos de colagénio distintos.⁽²⁵⁾ Atualmente, o colagénio é comumente utilizado na área dos biomateriais para aplicações biomédicas devido às suas excelentes características e propriedades físico-químicas. Além disso, é facilmente modificado através da reação dos grupos funcionais com outras ligações ou moléculas de modo a criar uma vasta variedade de materiais com propriedades biológicas e mecânicas adaptadas.^(21, 26) A problemática da utilização do colagénio na sua forma pura deve-se, essencialmente, à rápida degradação e à reduzida resistência mecânica o que limita a sua potencial utilização. No entanto, a reticulação dos *scaffolds* com base em colagénio, é um método efetivo na otimização das propriedades mecânicas e na modificação da taxa de degradação que tem vindo a ser utilizado.^(27, 28) Para além disso, a incorporação de nanocristais de hidroxiapatite em *scaffolds* de colagénio diminui o tamanho dos poros. Porém permite aumentar a área total e, conseqüentemente, a robustez deste polímero na estrutura final.⁽²⁹⁾

2.2.2 Hidroxiapatite

A matriz óssea, como referido anteriormente, é a maior reserva mineral pois contém cerca de 99% de cálcio e 88% de fosfato da quantidade total existente no corpo humano. A parte inorgânica da matriz óssea consiste maioritariamente em cristais de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) com cerca de 200nm de comprimento para os cristais de maiores dimensões.⁽¹⁸⁾ A apatite biológica corresponde a nanocristais com pequenas partículas de HA, pobres em cálcio e com reduzido número de grupos hidroxilo na sua estrutura. Estas características únicas conferem propriedades físico-químicas e biológicas muito específicas à apatite.⁽³⁰⁾

A hidroxiapatite é uma cerâmica bioativa que pertence ao grupo de fosfatos de cálcio com um ratio molar 1.67 Ca/P comumente utilizada em cirurgia para a reparação e substituição de tecidos duros, aplicações dentárias e/ou maxilofaciais devido às suas propriedades similares com a composição mineral óssea.^(13, 31, 32) *Stübinger* e colaboradores (2009) utilizaram um biomaterial com base em partículas nanométricas de hidroxiapatite para a intervenção cirúrgica de levantamento do seio em 20 pacientes. Os autores concluíram que este material apresentava excelente compatibilidade com o tecido ósseo circundante e que ao fim de 6 meses havia sido formado tecido ósseo sem reação

inflamatória.⁽³³⁾ Uma vez não tóxica, com elevado potencial bioativo e com potencial osteoindutivo, a hidroxiapatite sintética é também muito utilizada como revestimento em implantes para facilitar a osteointegração.^(34, 35) Relativamente à bioatividade, a adição de substitutos iônicos tais como Na^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} ou Fe^{3+} pode ser melhorada. Para além disso, a utilização destes iões na hidroxiapatite promove a proliferação de osteoblastos e o metabolismo ósseo.⁽³⁶⁾ Contudo, a hidroxiapatite na sua forma pura é altamente solúvel quando em contato com fluidos corporais simulados que afetam a estabilidade estrutural e química a longo termo. Neste sentido, novos métodos de processamento da hidroxiapatite tem vindo a ser estudados de modo a obter boas propriedades mecânicas e maior resistência à dissolução.⁽³⁷⁾

2.2.3 Proteínas não colagenosas

As proteínas não colagenosas correspondem a 10-15% do total das proteínas ósseas. Aproximadamente 25% das proteínas não colagenosas são exógenas incluindo a albumina sérica, responsável pela regulação da mineralização da matriz e a glicoproteína-2-HS. Esta molécula estabelece ligação aos cristais de hidroxiapatite devido às suas propriedades acídicas, atuando na regulação da proliferação celular a nível ósseo. Grande parte destas moléculas são sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos e são categorizadas em proteoglicanos, proteínas glicolizadas e proteínas carboxiladas. A função de cada tipo proteico ainda não é bem conhecida, no entanto, acredita-se que está relacionado com a regulação da deposição mineral, diferenciação celular e atividade celular.^(7, 38) Quanto à fosfatase alcalina, é a principal proteína glicosilada presente no tecido ósseo. Esta molécula está ligada à superfície dos osteoblastos e também está presente na matriz mineralizada. Ainda que a sua função não seja clara, tem um papel preponderante na mineralização óssea.

Apesar da fosfatase alcalina ser a principal proteína não colagenosa presente no osso, a osteonectina é a mais prevalente (2%) e está relacionada com o crescimento e/ou proliferação dos osteoblastos e com a mineralização da matriz.⁽⁷⁾ A nível dos tecidos duros dentários, a fosfoforina dentina (*DDP*) está envolvida na dentinogénese e na mineralização óssea. A amelogenina (proteína hidrofóbica) também é reportada como fator essencial na formação de apatite ao longo das fibrilas de colagénio (testes *in vitro*).⁽³⁸⁾ A primeira proteína não

colagenosa identificada foi a glicoproteína *sialic acid-rich*, de seguida a sialoproteína óssea (*BSP*) e outras glicoproteínas tais como a proteína S, osteonectina, trombospondina, fibronectina e osteopontina (*OPN*).^(18, 39) As proteínas não colagenosas mais comuns presentes na matriz óssea como a *BSP* e a *OPN* contêm resíduos fosforilados (por exemplo a fosfoserina) que promovem a capacidade de ligação aos iões Ca^{2+} , isto é, os resíduos fosforilados estão envolvidos na ligação destas proteínas à hidroxiapatite. Este processo deve-se ao facto destes resíduos fosforilados estarem localizados preferencialmente nos domínios ricos em serina contendo uma superfície de carga extremamente negativa que atrai os iões de cálcio promovendo o desenvolvimento de cristais de hidroxiapatite.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ Neste sentido podemos afirmar que a fosfoserina mimetiza as funções das proteínas não colagenosas como a *OPN*.

As primeiras investigações realizadas demonstraram influência favorável da fosfoserina com os materiais desenvolvidos como cimentos e compósitos baseados em cálcio e fosfato bem como a viabilidade celular dos osteoblastos presentes nos materiais modificados com esta molécula.⁽⁴³⁾ Estudos realizados em 2009 por *Lode et al.*, permitem concluir que a fosfoserina aumenta a atividade de fatores de crescimento vascular endotelial (*VEGFs*) quando adicionada à superfície de cimentos ósseos com cálcio e fosfato.⁽⁴⁴⁾ Não obstante, outros estudos realizados anteriormente, confirmam que apesar deste aminoácido fosforilado não estar diretamente envolvido na adesão celular, é bem conhecido o seu papel como catalisador na formação de hidroxiapatite em tecidos vivos e a contribuição para a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos e em linhas celulares idênticas.^(39, 41, 45) Em 2007, *Schneiders et al.*, realizaram um estudo em que avaliaram cimentos de hidroxiapatite nanométrica contendo colagénio tipo I modificados com citrato de sódio, carbonato de cálcio e fosfoserina. Os resultados permitiram concluir que existe relação destas modificações com a remodelação óssea em estados iniciais com consequente formação óssea.⁽⁴⁶⁾ Para além dos efeitos obtidos direta ou indiretamente no processo de reparação óssea, a fosfoserina é de fácil obtenção, não implica elevados custos e é de fácil manipulação. Os resíduos de fosfoserina na superfície das fibrilas colagénicas podem iniciar a enucleação e o crescimento de minerais, o que permite concluir

que a fosfoserina apresenta alto potencial na utilização em novos materiais para a regeneração óssea.⁽⁴⁷⁾

3. Remodelação/reparação óssea

Para manter a integridade do osso, este é constantemente remodelado ao longo da vida através dos processos de reabsorção e formação óssea inerentes a múltiplos eventos como migração, diferenciação e ativação de diversos tipos celulares e tecidulares.^(13, 27, 48) Com o avanço da idade, o osso perde características como a ductilidade o que contribui para o aumento da fragilidade e conseqüentemente pode ocorrer fratura óssea.⁽⁴⁹⁾ O processo reparativo pode ser iniciado com um sinal hormonal, por exemplo. com o aumento de *PTH* em resposta a hipocalcemia ou com condições locais, como instabilidade mecânica ou defeitos ósseos persistentes, que conduzem à ativação dos osteoclastos. Ou ainda como agressão ao sistema imunitário, pois a resposta inflamatória também contribui para o início do processo de reparação óssea. A lesão despoleta a libertação de citocinas inflamatórias que através da quimiotaxia recruta células inflamatórias e estimula a angiogénese no local da lesão.^(8, 50)

Na cavidade oral, tal como no resto do organismo, também ocorrem fenómenos que induzem o processo reparativo inerente aos tecidos intra-orais. Tal como ocorre na Ortodontia, em que o movimento dentário induz uma resposta inflamatória, o deslocamento das peças dentárias é obtido através de repetidos processos de remodelação óssea alveolar através de reabsorção e aposição óssea, isto é, a remodelação óssea ocorre através de processos de ativação-reabsorção na zona de pressão ou ativação-formação na superfície óssea, que sofre tensão através das forças exercidas para obtenção do movimento dentário desejado.⁽⁵¹⁻⁵³⁾ A nível periodontal, após extração dentária, ocorre formação de um coágulo cicatricial no alvéolo que lentamente promove a remodelação com a formação inicial de uma matriz para posterior crescimento de tecido ósseo.⁽⁵⁴⁾ Assim sendo, a reparação é um processo complexo que pode ser definido como ativação dos osteoclastos presentes na superfície óssea para reabsorver a matriz, seguida da ativação dos osteoblastos para formar novo tecido. Estes dois processos, reabsorção e deposição óssea, estão intimamente

ligados pelo que, idealmente, a quantidade de tecido ósseo reabsorvido deve ser igual à quantidade de osso neoformado.⁽⁸⁾

4. Tratamento de defeitos ósseos

Os defeitos ósseos podem ter origem em situações de trauma, infecção, tumores ou desordens genéticas. O sucesso do tratamento destes defeitos depende do tamanho e da qualidade do tecido adjacente à lesão existente pelo que em algumas situações é necessário recorrer aos enxertos ósseos para reparação da lesão.^(50, 55) A nível craniomaxilofacial, os defeitos podem variar de pequenos (alguns milímetros) a grandes segmentos em consequência de trauma, excisões cirúrgicas ou cranioplastia. Estes defeitos requerem uma estrutura complexa tridimensional que é difícil de restaurar, isto é, defeitos mandibulares exigem a restauração da integridade mecânica, a função articular e a normoclusão dentária intermaxilar restabelecidas.⁽⁵⁶⁾ A etiologia da perda óssea no sistema estomatognático pode também ter origem em doenças de foro periodontal como a periodontite. A progressão da doença periodontal, como resposta inflamatória à presença de biofilme bacteriano na cavidade oral, conduz à perda irreversível dos tecidos de suporte e até mesmo perda das peças dentárias. A abordagem terapêutica inicialmente utilizada é a remoção dos agentes etiológicos e manutenção dos cuidados de higiene oral. No entanto, nenhum destes métodos permite a recuperação do tecido ósseo perdido. Nesse sentido, na área da Medicina Dentária, a cirurgia periodontal é uma das especialidades clínicas pioneiras na utilização de enxertos para a correção de defeitos ósseos que comprometem a função e a estética da cavidade oral.⁽⁵⁷⁾

O enxerto ósseo pode ser definido como um material implantado para promover a reparação óssea, atuando por si só ou combinado com outros materiais. A reparação óssea é dependente dos mecanismos de osteocondução, osteoindução e osteogénese, pelo que o enxerto ideal teria estes três mecanismos promovendo um modelo que direciona o crescimento ósseo tridimensionalmente, estabelecendo o recrutamento de células e induz a diferenciação de células ósseas residentes e fornece ainda mais células no local de implantação.⁽⁵⁶⁾ Os enxertos ósseos podem então ser classificados em auto-enxertos, alo-enxertos, xeno-enxertos e enxertos aloplásticos.⁽⁵⁷⁾ Os auto-

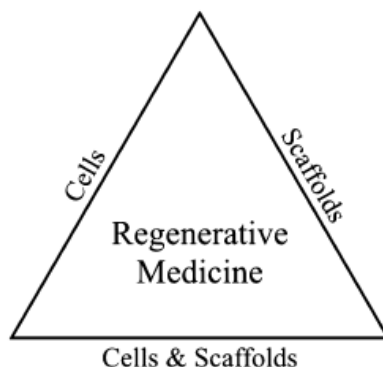
enxertos ou enxertos autólogos são considerados, desde há muito tempo, o “*gold standard*” e continuam desde então a ser o método mais efetivo para a reparação óssea, uma vez que promovem a osteocondução, osteoindução e conseqüentemente, a osteogénese diretamente na superfície óssea sem desencadear qualquer resposta imunológica. Neste tipo de enxerto o paciente, é simultaneamente dador e hospedeiro. Os locais mais comuns de obtenção de tecido para enxerto são o crânio, a tibia e a crista ilíaca.⁽⁵⁸⁾ Apesar destes processos apresentarem sucesso clínico, têm algumas desvantagens como a disponibilidade de tecido (quando é necessário elevadas quantidades de tecido) e morbidade do hospedeiro (em caso de defeitos ósseos de grandes dimensões aumenta a taxa de morbidade). Além disso, é difícil prever a taxa de degradação do enxerto. Desta forma, os alo-enxertos ou enxertos alogénicos são uma opção terapêutica para superar as desvantagens dos enxertos autólogos. Neste método, é obtida uma porção de tecido de um indivíduo dador para aplicar no hospedeiro (ambos humanos, porém geneticamente diferentes). Tal como nos auto-enxertos a osteocondução está presente, mas a osteoindução é limitada, no entanto, há complicações associadas como a eventual transmissão de doenças ou infeções bacterianas. Para além disso, diferenças nas técnicas adotadas para a preparação do enxerto conduzem à inconsistência e fratura ou deiscência do tecido e diferenças na qualidade do tecido entre o dador e o hospedeiro.^(55, 59)

Com o avanço tecnológico na área dos Biomateriais, a utilização de tecidos de origem animal não humano (ou seja, material de enxerto obtido de uma espécie diferente do hospedeiro- xenoenxerto) para a reconstrução de tecido humano tem vindo a ser uma opção terapêutica quando os auto-enxertos ou os alo-enxertos não são viáveis. Atualmente, existem vários xeno-enxertos disponíveis no mercado com base de colagénio obtido maioritariamente de tecido bovino ou porcino e que podem ser utilizados simples ou combinados com outros materiais sintéticos para a substituição óssea.⁽⁵⁶⁾ Os substitutos ósseos podem ser materiais sintéticos, inorgânicos ou com características orgânico-biológicas, como matriz óssea desmineralizada, cerâmicas ósseas, implantes porosos de polietileno e polímeros que são inseridos no tratamento de defeitos ósseos sem recorrer aos enxertos ósseos autógenos e alógenos.^(57, 58, 60, 61) Desta forma, a engenharia de tecidos assume um papel importante na aplicação

e desenvolvimento de novos materiais combinados com células do hospedeiro de modo a evitar as desvantagens dos enxertos usualmente selecionados como opção terapêutica. Nesse sentido, os materiais sintéticos têm vindo a ser alvo de vários estudos de forma a conferir aos substitutos ósseos, estrutura e composição química similar ao osso natural sem apresentar os problemas dos enxertos referidos previamente.⁽⁹⁾

5. Medicina Regenerativa- Engenharia de tecidos

O termo Medicina Regenerativa surgiu em 1999 por *William Haseltine* durante uma conferência realizada perto do Lago Como em Itália com o intuito de descrever uma nova área de conhecimento que relaciona diferentes temas como engenharia de tecidos, transplante de células, biologia das células estaminais, próteses biomecânicas, nanotecnologia e bioquímica. Atualmente, a Medicina Regenerativa é definida como uma área de pesquisa multidisciplinar com o objetivo principal de reparar órgãos, danos tecidulares e celulares bem como criar novos meios de substituição de forma a promover a função normal sem recorrer à transplantação.^(13, 62) A estratégia para conseguir estes objetivos inclui introduzir biomateriais e agentes de modulação como *scaffolds* com base na matriz extracelular, células e fatores de crescimento nos locais de lesão para estimular a regeneração.⁽⁶³⁾ Existem por isso três diferentes abordagens para alcançar o principal objetivo da medicina regenerativa: terapia de base celular, utilização de materiais biológicos ou sintéticos para promover os processos de reparação e proliferação celular e implementação de *scaffolds* com incorporação de células (*figura 3*).⁽⁶²⁾



Os Figura 3 Estratégias utilizadas em Medicina Regenerativa. ⁽⁶²⁾

Os *scaffolds* promovem, assim, o suporte funcional e estrutural que a matriz extracelular confere aos tecidos. Durante os últimos anos, os estudos que se focam na matriz extracelular provam que esta tem um papel preponderante em diferentes funções, como já foi referido anteriormente, e que podem ser reproduzidas pelos biomateriais enriquecidos com fatores bioativos como fatores de crescimento e citoquinas. Em teoria, os biomateriais devem imitar as propriedades dos tecidos a substituir e promover o suporte essencial para a função celular bem como apresentar um ratio de degradação equivalente ao ratio de regeneração sem que existam reações tóxicas e respostas imunológicas.^(62, 64) Assim, com a necessidade incessante de obter matriz extracelular óssea que mimetize o osso nativo e que simultaneamente exerça a estrutura necessária para a adesão de osteoblastos e reserva para fatores de crescimento, o *design* de novos *scaffolds* tem vindo a ser um desafio para a comunidade científica.⁽⁵⁸⁾

5.1 Scaffolds

Os *scaffolds* têm vindo a ser utilizados para fornecer o suporte físico e biológico necessário para a restauração da função na regeneração de tecidos. A sua principal potencialidade é a matriz altamente porosa com poros interconectados que permite atuar como estrutura modelo para a transferência de nutrientes, oxigénio e produtos provenientes do metabolismo do ambiente tecidual circundante.⁽¹¹⁾ O tamanho ideal dos poros é cerca de 100-400 μm para que ocorra colonização celular e proliferação favoráveis.⁽⁶⁵⁾ O *scaffold* deve permitir a adesão celular, migração, proliferação e diferenciação através do transporte de fatores de crescimento e outras moléculas para o local da lesão e facilitar o recrutamento de células progenitoras hospedeiras que atuam no processo de regeneração óssea e integração tecidual para a formação de novo tecido ósseo.⁽⁶⁶⁾ O processo de osteocondução e osteoindução são requisitos essenciais na função dos *scaffolds*. A osteocondução refere-se não só à habilidade do material para orientar a diferenciação e proliferação de células, mas também para a apresentação de um modelo estrutural a seguir pelo tecido ósseo em crescimento. A osteoindução refere-se ao processo bioquímico inerente ao recrutamento celular para o local da lesão, às propriedades de adesão das células progenitoras e à distribuição de fatores de crescimento

necessários aos processos de diferenciação e proliferação celular.^(11, 58) Para além destas características, também deve ser degradado pelo organismo para que o espaço por este ocupado seja substituído por tecido novo. Assim, o ratio de degradação deve ser proporcional ao ratio de formação de tecido, isto é, se a degradação do *scaffold* é mais rápida que a formação tecidual, pode ocorrer fratura do tecido ósseo em crescimento, mas se a taxa de degradação for superior pode não ocorrer a formação ideal de tecido.⁽¹⁾

O sucesso clínico e cirúrgico do implante depende também de um material que não desencadeie uma resposta inflamatória crónica e, por isso, os *scaffolds* devem ser biocompatíveis. Uma forma de obter a biocompatibilidade é utilizar materiais que mimetizem a função biológica, isto é, utilizar componentes biológicos na produção de *scaffolds*. Tal como referido anteriormente, o colagénio é o componente *major* do osso, com uma estrutura fibrosa e um diâmetro de 50 - 500 nm que influencia a adesão, proliferação e diferenciação celular necessárias durante a regeneração óssea. Os cristais nanométricos de hidroxiapatite, que constituem a componente inorgânica da matriz extracelular, têm aproximadamente 50 nm de comprimento, 25nm de largura e 2-5nm de espessura e estão dispersos pelas moléculas de colagénio.⁽⁶⁷⁾ A hidroxiapatite é um candidato ideal aos implantes ortopédicos e dentários devido à sua excelente biocompatibilidade e integração óssea, no entanto, as aplicações clínicas são limitadas devido às baixas propriedades mecânicas e elevada taxa de fratura. Contudo, com a evolução de *scaffolds* baseados em nanocompósitos e polímeros como colagénio/nano-hidroxiapatite, estes aspetos podem ser melhorados.^(67, 68)

5.1.1 Métodos de produção

Existem diferentes técnicas para a obtenção de *scaffolds* 3D tais como liofilização, evaporação de solventes, lixiviação de partículas (sais), prototipagem rápida, introdução de gases para formação de esponjas, separação de fase por termoindução, deposição de fibras (*electro-spinning*) e moldagem por fusão, no entanto, estes métodos podem ser muito complexos, requerem equipamentos muito específicos e utilizam altas temperaturas ou solventes orgânicos perigosos.^(65, 69, 70) Contrariamente, a técnica de criogelação

para a obtenção de *scaffolds* de alta porosidade é um método simples que ainda não é muito utilizado pela comunidade científica, mas já tem vindo a ser divulgado como um método interessante para a obtenção de sistemas poliméricos altamente porosos.⁽⁷¹⁾

5.1.2. Criogelação

A técnica de criogelação consiste na congelação da solução inicial a uma temperatura não inferior a dez graus do ponto de cristalização do solvente puro. Nesta fase, o solvente resultante não está completamente sólido pelo que uma pequena quantidade de líquido não congelado está presente entre os cristais formados (microfase de líquido não congelado) e será dissolvida com o polímero concentrado para que ocorram reações de interligação. Estas reações permitem que a formação do gel e os cristais de solvente congelados formem poros. Após descongelar a amostra, uma rede de poros interconectados está presente no interior do gel (locais ocupados pelos cristais de gelo) (*figura 4*).⁽⁷²⁾

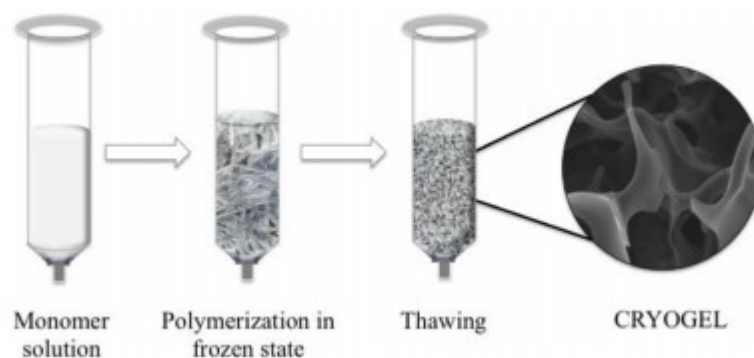


Figura 4 Representação esquemática da técnica de criogelação. ⁽⁷⁰⁾

O tamanho dos cristais de gelo e conseqüentemente dos poros depende da temperatura de congelação pois uma temperatura baixa permite obter poros pequenos e uma temperatura alta permite obter poros maiores. No entanto, fatores como concentração do soluto inicial e concentração do polímero utilizado podem também influenciar a porosidade.⁽⁷¹⁾ As técnicas de criogelação e de congelação-secagem seguem basicamente o mesmo princípio na síntese de *scaffolds* porosos, mas ao contrário da técnica de congelação-secagem, a técnica de criogelação decorre num único passo.^(73, 74) A grande vantagem da técnica de criogelação é a obtenção de géis altamente porosos sem solventes

orgânicos ou aditivos perigosos durante o processo de produção.⁽⁷⁵⁾ A estrutura altamente porosa destes géis consiste na interconexão de poros com dimensões superiores a 100 μm rodeados por paredes densas e não porosas enquanto os géis obtidos por técnicas convencionais são homogêneos e microporosos. Devido à adição do concentrado polimérico, a turgescência é menor do que a turgescência obtida pelos géis produzidos à temperatura ambiente, e 3-6 a vezes menor em géis produzidos a altas temperaturas.⁽⁷²⁾ Para além destas vantagens mencionadas, este método não requer quaisquer solventes orgânicos e permite controlar a porosidade dos *scaffolds* em função da aplicação.⁽⁷⁶⁾

Atualmente existem inúmeras publicações descrevendo a vasta variedade de grupos distintos de criogéis, de acordo com o material base. São considerados pelo menos quatro tipos diferentes de materiais: (1) precipitados gelatinosos obtidos por crioprecipitação; (2) materiais para o armazenamento de energia térmica ou materiais poliméricos congelados; (3) criogéis poliméricos e inorgânicos produzidos pela técnica de gelificação-solidificação seguida de congelação-secagem incluindo óxidos orgânicos individuais ou misturados, polímeros, híbridos, compósitos e criogéis de carbono; (4) polímeros sintéticos e naturais ou criogéis proteicos produzidos por um solvente congelado, usualmente água, através da congelação criotrópica. O grupo de criogéis mais conhecido e explorado é o que utiliza proteínas, nomeadamente o colagénio e a gelatina devido à excelente biocompatibilidade.⁽⁷⁷⁾ No entanto, os polímeros de origem natural apresentam várias desvantagens tais como, reduzidas propriedades mecânicas, baixa reprodutibilidade (dependendo da fonte de obtenção), elevada solubilidade ou elevada hidroflicidade, potencial desnaturação durante o processamento e elevada taxa de biodegradação. Nesse sentido, é imprescindível a utilização de um agente de ligação para modificar a taxa de degradação e otimizar as propriedades mecânicas.^(21, 78) Para além disso, a incorporação de componentes minerais como a hidroxiapatite em *scaffolds* não-fibrosos permite a formação de um material que mimetiza a matriz extracelular óssea.⁽⁷⁹⁾

5.1.2.1 Criogéis- Propriedades e aplicações

Os criogéis tem algumas características importantes que determinam a sua utilização como *scaffold* tais como a elevada porosidade devido a macroporos interligados entre si, estabilidade mecânica (podem resistir a elevados níveis de deformação, incluindo quando submetido a forças de tensão, compressão e flexão), elasticidade, reversibilidade, elevada permeabilidade, rápida alteração de tamanho induzida por forças externas e boa capacidade de turgescência em meio aquoso.^(65, 71, 75) A interligação entre os macroporos permite conferir suporte para o crescimento, proliferação e migração celular. Comparativamente com os hidrogéis obtidos por outras técnicas em que o transporte de nutrientes ocorre apenas difusão facilitada, os criogéis permitem o transporte mediado de nutrientes e a eliminação de metabolitos.⁽⁸⁰⁾

As aplicações biomédicas dos criogéis têm vindo a despertar interesse na comunidade científica devido aos resultados promissores em estudos efetuados recentemente. Em 2010, *Mu et al.* prepararam criogéis 3D de colagénio tipo I onde era possível observar uma estrutura heteroporosa com poros interligados de forma e estabilidade térmica favoráveis relativamente ao colagénio no estado puro.⁽⁷⁸⁾ Mais recentemente, em 2013, *Rodrigues et al.*, caracterizaram física e morfologicamente e avaliaram o comportamento *in vitro* de três diferentes scaffolds biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite. Os autores concluíram que esta combinação de materiais produz *scaffolds* com elevada taxa de microporosidade e macroporosidade, fornece o ambiente necessário para a adesão e proliferação celular e apresenta ainda melhoria nas propriedades mecânicas.⁽⁶⁵⁾ No mesmo ano, outros investigadores realizaram estudos *in vivo* relativamente ao tratamento de defeitos ósseos cranianos em que utilizavam criogéis com base em hidroxiapatite. Segundo os resultados obtidos deste estudo, este tipo de *scaffold* exibe integração tecidual óssea quanto ao processo de reparação óssea intrínseco com elevada estabilidade no processo de mineralização.⁽⁸¹⁾ Atualmente, os criogéis são utilizados em várias áreas da Biotecnologia como materiais de cromatografia, mobilização de moléculas e células de libertação controlada, matrizes para separação celular e em cultura de células e regeneração tecidual, como referido previamente.^(73, 80, 81) Não obstante, parte da comunidade científica tem explorado a aplicabilidade dos

criogéis na engenharia de tecidos na vertente da Medicina Dentária e na reconstrução da cavidade oral.

Em Medicina Dentária, a engenharia de tecidos pode ser aplicada em diferentes tecidos relacionados com a cavidade oral incluindo o osso, a cartilagem, a pele e a mucosa oral, a dentina e o tecido pulpar bem como as glândulas salivares.⁽⁸¹⁾ Estudos realizados anteriormente, mostram que estruturas dentárias como esmalte, dentina, cemento e câmara pulpar podem ser regenerados através de abordagens para a regeneração óssea com recurso a *scaffolds*.⁽⁸²⁾ Para além disso, em situações clínicas específicas como preservação alveolar, aumento ósseo para garantir a estabilidade de implantes dentários e elevação do seio maxilar para aumento da base óssea em pacientes com perda óssea acentuada na região molar e pré-molar, as abordagens da engenharia de tecidos utilizando *scaffolds* simples ou com a combinação de fatores de crescimento, distribuição de células ou genes, tem vindo a ser implementadas.⁽⁸³⁾ Um dos *scaffolds* utilizados para a regeneração óssea intra-oral em situações de cirurgia para aumento do seio maxilar, por exemplo, é o OsteoBone™. O OsteoBone™ consiste numa matriz de cálcio, silicone e fósforo com geometria biomimética 3D favorável à adesão celular, à formação de novo tecido ósseo e à angiogénese. Apresenta boas propriedades como substituto ósseo com porosidade aceitável e osteocondutividade bem como comportamento mecânico apropriado. Relativamente aos tecidos moles da cavidade oral, as lesões na mucosa oral que necessitem da intervenção de engenharia de tecidos, são abordadas com alguns materiais existentes no mercado como *Dermagraft*™ e *TransCyte*™, como *scaffolds* sintéticos de PLGA (poli(lactido-co-glicólido)) e silicone, respetivamente. No entanto, a mucosa oral é um tecido altamente vascularizado pelo que para obter maior sucesso na reparação tecidular é necessário utilizar materiais altamente porosos que permitam a invasão e crescimento de vasos sanguíneos. A técnica de congelação - secagem apresenta ótimos resultados para a obtenção de *scaffolds* macroporosos atualmente utilizados no tratamento da mucosa oral.⁽⁸⁴⁾ No entanto, pelas razões apresentadas anteriormente, a técnica de criogelação é mais simples e permite obter *scaffolds* com elevada performance. Assim, os substitutos ósseos e mucosos existentes atualmente podem ser melhorados com

a aplicação de criogéis com base em componentes de origem animal de forma a mimetizar a estrutura e a função o tecido lesado ou perdido.

Materiais e métodos

Materiais e métodos

1. Materiais

O colagénio do tipo I proveniente do tendão de Aquiles bovino utilizado foi comprado à *Sigma-Aldrich (st. Louis, Mo)*, o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e o N-hidroxisuccinamida (NHS) foram adquiridos na *Fluka (Buchs, Suíça)*, o ácido clorídrico foi obtido da *Merck (Alemanha)*, e os agregados de nano-HA foram cedidos pela *Fluidinova S.A. (Maia, Portugal)*;

2. Preparação dos criogéis de colagénio e nano-hidroxiapatite com fosfoserina

O colagénio do tipo I foi anteriormente obtido emergindo-o em 5 mM de HCL a 2% (wt/vol), durante a noite a 4°C. De seguida, a solução obtida foi homogeneizada a 11,000 rpm (*Ultra Turrax T25, IKA*) em banho de gelo e centrifugada a 2000g durante 5 min. O criogel de colagénio/nano-hidroxiapatite foi preparado com 5mL de colagénio diluído em 4mL de HCL (5mM) e agregados de nanoHA até um ratio de colagénio-nanoHA a 50:50 wt/wt%. De seguida, foram adicionados 5mg de fosfoserina (amostra 2) e 1 mg de fosfoserina (amostra 3) em duas soluções distintas, solução 1 e solução 2, respetivamente. A cada solução foram adicionados 10 mM NHS e 40 mM de EDC ao colagénio e transferidos para uma seringa de 5 mL (*Terumo syringe*) para servir como molde. Realizou-se ainda uma solução de colagénio/nano-hidroxiapatite como amostra de controlo. As soluções foram preparadas em banho de gelo ao longo de todo o protocolo e após obtenção das soluções finais, foram armazenadas a -18°C durante 24h de modo a promover a reticulação entre os compostos adicionados. Após este período de tempo, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e os *scaffolds* obtidos foram lavados com água destilada e finalmente liofilizados a -80°C com pressão controlada de 0.0003 bar durante 24h em um liofilizador (*Labconco, Freezone 6*).

3. Caracterização dos criogéis

Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A morfologia de superfície das amostras dos criogéis foi observada através de Microscopia Eletrônica de Varrimento (*SEM, FEI Quanta 400FEG*). Os *scaffolds* de colagénio e colagénio-nanoHA foram fixados com *Araldite™* a um suporte de amostras. De seguida, as amostras foram revestidas com ouro-paládio (*Bal-Tec: SCD 050*) de forma a poderem ter condutividade elétrica à superfície e serem então analisadas.

O tamanho dos poros presentes nos *scaffolds* foi determinado com auxílio de um software específico (*Image J; Wayne Rasband*) usando a fórmula:

$$D = [(4 \times A)/\pi]^{1/2}$$

em que *D* é o diâmetro do poro e *A* é a área de projeção circular do poro na imagem obtida. Foram analisados no total 200 poros em cada imagem de cada amostra.

Espetroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras secas (2 mg) foram fragmentadas e adicionadas a 200 mg de brometo de potássio (KBr) em um almofariz para posteriormente serem comprimidas até finos discos. Cada disco foi observado a uma resolução de 1 cm⁻¹ a uma frequência de 400-4000cm⁻¹ com recurso a um espectrofotómetro *FT-IR (Perkin Elmer)* e os picos de transmitância foram registados. Em cada espectro obtido, foram realizados 100 varrimentos na amostra.

Análise Mecânica Dinâmica (DMA)

A Análise Mecânica Dinâmica (DMA) realizou-se com o intuito de caracterizar o comportamento mecânico dos *scaffolds* biocompósitos de colagénio e nano-HA com e sem fosfoserina sob compressão. Antes da medição, as amostras com cerca de 5mm de espessura e 9mm de diâmetro foram submergidas em solução salina tampão (*PBS-Phosphate buffered saline*) durante 1h até atingir o equilíbrio de absorção de água.

Os *scaffolds* foram sujeitos a ciclos de compressão com frequências progressivas na ordem dos 0.1 a 10Hz à temperatura ambiente durante 10 minutos utilizando o equipamento *Tritec2000* (Triton Technology, UK). Para obtenção dos valores médios foram analisadas três amostras de cada tipo de material.

Análise das propriedades de absorção de solventes

A capacidade de absorção dos *scaffolds* foi realizada à temperatura ambiente através da imersão das amostras em solução salina (PBS) e em água ultra-pura. Após os tempos de avaliação as amostras foram secas com papel de filtro de modo a remover o excesso de solvente. Utilizaram-se 6 *scaffolds* representativos de cada amostra com cerca de 9 mm de diâmetro e 5 mm de espessura foram pesados antes e depois da imersão nos diferentes solventes (15 minutos, 30 minutos e 60 minutos). O equilíbrio de absorção foi calculado segundo a fórmula:

$$Cw (g.g^{-1}) = \frac{W_s - W_d}{W_d}$$

em que W_s e W_d correspondem aos pesos das amostras depois e antes da imersão em água e PBS, respetivamente.

Resultados

Resultados

1. Morfologia dos materiais analisados por Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

O SEM é comumente utilizado para medir partículas bem como determinar a composição e as propriedades morfológicas na superfície dos materiais em análise. No entanto, também permite observar o arranjo da superfície ou sub-superfície das estruturas dos poros, bem como calcular o tamanho dos poros em caso de materiais porosos.⁽⁸⁵⁾ A *Figura 5* mostra as imagens obtidas por SEM dos *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite e colagénio/nano-hidroxiapatite com a incorporação de fosfoserina. É possível observar uma morfologia heteroporosa com uma estrutura tridimensional altamente interconectada. No entanto, com a incorporação da fosfoserina, a rede de interligação é menor comparativamente com os *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra controlo).

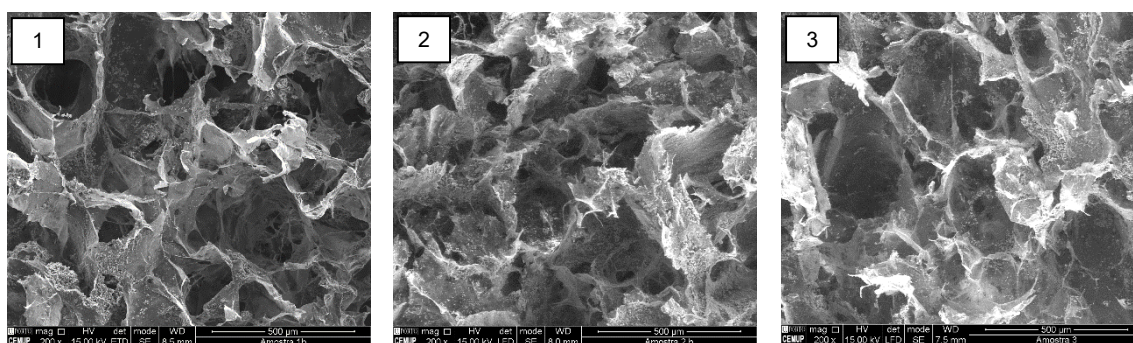


Figura 5 Imagens obtidas por Microscopia Eletrónica de Varrimento das amostras seccionadas de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1), colagénio/nano-hidroxiapatite com 5 mg de fosfoserina (amostra 2) e colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoserina (amostra 3). Ampliação: x 200.

Para a obtenção de informação relativamente à porosidade dos biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite, as imagens resultantes da SEM foram analisadas pelo software *ImageJ*. Os poros passíveis de observação correspondentes ao intervalo compreendido entre 10 e 300 μm foram medidos utilizando as ferramentas do software de imagem e obteve-se as médias de 89,87 \pm 75 μm para os *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1), 23,95 \pm 65 μm para os *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite com 5 mg de fosfoferina (amostra 2) e 18,2 \pm 60 μm para os *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoferina (amostra 3) (*Tabela 1*).

Tabela 1 Resultados da média, poro de maior e menor diâmetro (μm) dos *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1), colagénio/nano-hidroxiapatite com 5 mg de fosfoferina (amostra 2) e colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoferina (amostra 3).

MATERIAIS			
CARACTERÍSTICAS	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
PORO MAIOR (μM)	391	459	346
PORO MENOR (μM)	15	2	18
MÉDIA	89,87 \pm 75	23,95 \pm 65	18,2 \pm 60

A distribuição do tamanho dos poros das três amostras está representada na imagem seguinte (*Figura 6*). Os diferentes tipos de *scaffolds* apresentam uma estrutura heterogénea com elevada percentagem de poros entre 10 e 200 μm de diâmetro. A análise da distribuição da dimensão dos poros permite ainda concluir que as amostras modificadas com fosfoferina apresentam valores muito próximos da amostra 1 (controlo) relativamente à percentagem de poros com dimensão superior a 250 μm .

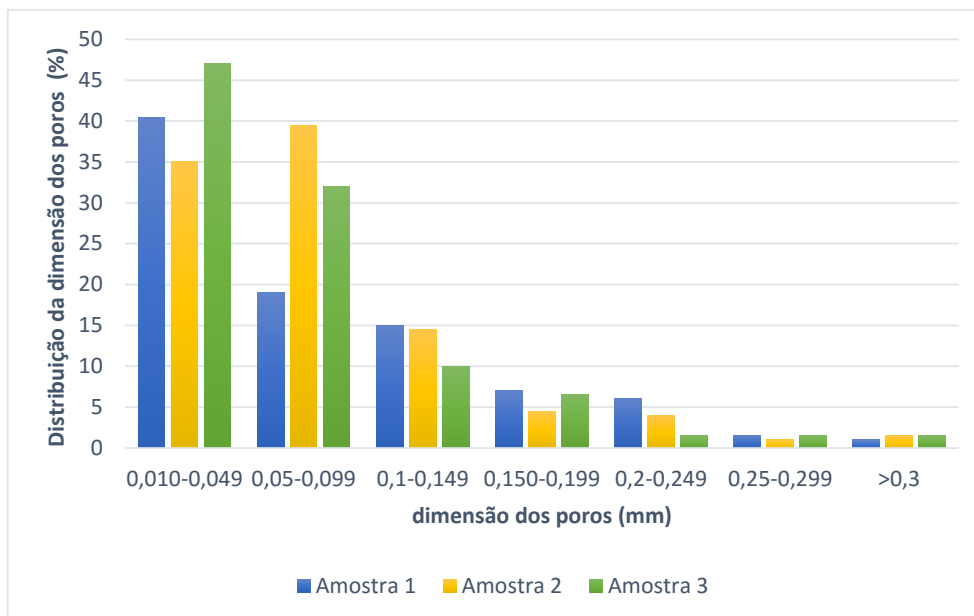


Figura 6 Distribuição da dimensão dos poros presentes nos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite modificados ou não com fosfoserina.

2. Análise das ligações químicas dos materiais por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

O FT-IR permite analisar as alterações nas ligações químicas antes e após a produção dos *scaffolds*. O resultado obtido das amostras em estudo através da FT-IR está representado na *Figura 7*. O espectro da amostra representativa dos *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite (amostra 1 - controlo) exhibe as bandas características do colagénio, isto é, o pico $1653,69\text{ cm}^{-1}$ é descrito como a amida I (ligação C=O), o pico $1550,68\text{ cm}^{-1}$ como amida II (deformação da ligação N-H) e a amida III é representada pelo pico $1237,26\text{ cm}^{-1}$ (deformação N-H). As bandas $1031, 873, 601$ e 564 cm^{-1} correspondem às vibrações moleculares dos grupos fosfato presentes nos agregados nanométricos de hidroxiapatite. Os picos 1031 e 873 cm^{-1} correspondem ao modo de vibração V3 e V1 do fosfato enquanto as bandas 602 e 564 cm^{-1} são correspondentes ao modo de vibração V4. Concluindo, o espectro dos *scaffolds* biocompósitos de colagénio e nano-hidroxiapatite modificados com o aminoácido fosforilado osteoindutor em estudo, é similar ao espectro dos *scaffolds*

biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite da amostra controlo, assim, a adição da fosfoserina não altera significativamente as ligações químicas finais das amostras 2 e 3.

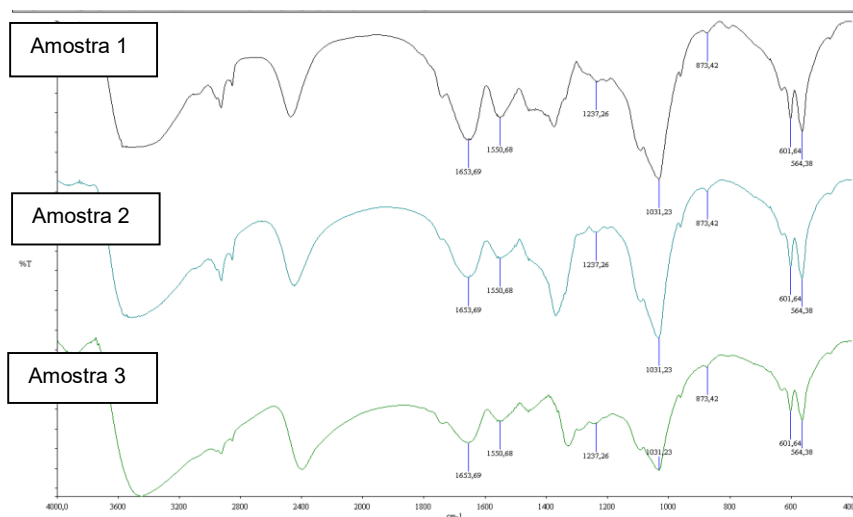


Figura 7 Espectro do FTIR relativo aos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra 1), aos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina 5 mg (Amostra 2) e 1 mg (Amostra 3).

3. Propriedades de absorção de solventes (*swelling*)

A capacidade de absorção é um parâmetro importante no desenvolvimento e implementação dos *scaffolds* pois facilita a adesão celular e a cinética de fluidos orgânicos. A *Tabela 2* apresenta o comportamento dos biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra 1) e dos scaffolds biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite modificados com fosfoserina (amostra 2 e amostra 3) quando imergidos em água ultrapura e *PBS*. A captação de fluidos pelos *scaffolds* aumenta rapidamente no estágio inicial atingindo o equilíbrio aos 15 minutos não havendo alteração significativa ao fim de 60 minutos. É evidente a ligeira alteração do coeficiente de absorção nos *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina (amostras 2 e 3) na presença de água. Contrariamente, quando emergidas em *PBS*, as amostras 2 e 3 apresentam uma redução no coeficiente de absorção. Estes resultados permitem ainda concluir que a adição da fosfoserina nas amostras iniciais não influencia

negativamente a absorção de água garantindo assim a capacidade de absorção dos biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite.

Tabela 2 Ratio de absorção das amostras de scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite (Amostra1), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoferina 5mg (Amostra 2), scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite 1 mg (Amostra 3).

Ratio de absorção					
	Massa inicial (g)	H2O (Cw)		PBS (Cw)	
		15	60	15	60
Amostra 1	0,021	0,347	0,361	0,4098	0,419
		±	±	±	±
		0,065	0,067	0,036	0,015
Amostra 2	0,014	0,337	0,347	0,3585	0,345
		±	±	±	±
		0,028	0,043	0,024	0,017
Amostra 3	0,0156	0,427	0,437	0,3769	0,353
		±	±	±	±
		0,042	0,061	0,149	0,084

4. Análise Dinâmico-Mecânica dos materiais (*DMA*)

A robustez mecânica é um fator determinante para a utilização de biomateriais na área da engenharia de tecidos, desse modo, o comportamento viscoelástico dos *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite modificados pela fosfoferina foi avaliado pela Análise Dinâmico-Mecânica (*DMA*). A *Figura 8A* representa a variação do módulo de armazenamento (E') em função da frequência aplicada (0,1 a 10 Hz). Segundo os resultados obtidos é possível observar que o E' reduz com a adição da fosfoferina nos biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite nas frequências mais baixas.

Porém, em altas frequências ambas as amostras (com e sem fosfoferina) apresentam módulos semelhantes. Relativamente à *Figura 8B*, que representa o *loss factor* (o ratio entre a quantidade de energia dissipada – E'' e a energia armazenada – E' , sendo chamado $\tan \delta$) em função da frequência previamente referida, é possível concluir que o $\tan \delta$ aumenta na presença da fosfoferina nas amostras 2 e 3.

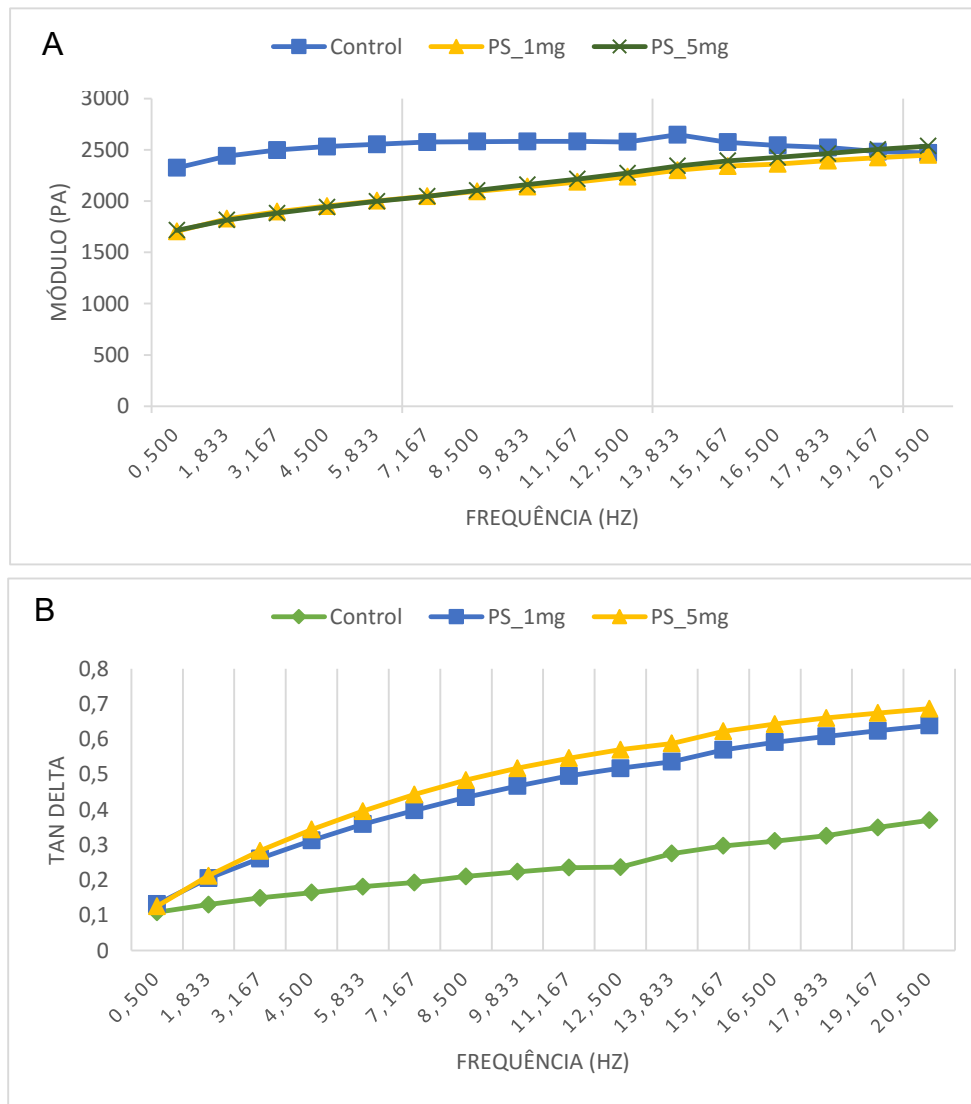


Figura 8 Módulo de armazenamento E' (A) e Loss factor – $\tan \delta$ (B) sob compressão dinâmica versus aumento de frequência, variação de 0,1 a 10Hz.

Discussão

Discussão

A presente monografia tem como principal objetivo avaliar as propriedades físico-químicas e mecânicas de *scaffolds* biocompósitos de colagénio/hidroxiapatite modificados com o aminoácido fosforilado, denominado por fosfoserina, para a regeneração óssea utilizando a técnica de criogelação. Para o efeito, realizaram-se testes laboratoriais de modo a avaliar as propriedades físico-químicas, morfologia de superfície e as propriedades mecânicas dos materiais em estudo. Através deste método é possível obter *scaffolds* com reprodutibilidade, robustez eficiente, elevada porosidade, resistência mecânica e estabilidade osmótica favoráveis em consequência de poros de grandes e pequenas dimensões interconectados entre si, sem quaisquer solventes orgânicos ou aditivos não biocompatíveis durante a sua produção. Esta técnica de obtenção de *scaffolds* macroporosos conquista a comunidade científica devido à facilidade de processamento e às propriedades que confere aos materiais, tais como o controlo da porosidade necessária, reprodutibilidade e baixo custo a uma dada aplicação em Engenharia de tecidos.⁽⁷⁶⁾

Alguns dos primeiros estudos publicados que reportam a utilização da técnica de criogelação para a obtenção de materiais poliméricos porosos, foram realizados por *Lozincky* em 1980.⁽⁷¹⁾ Com base na potencial aplicabilidade em regeneração óssea e de acordo com a evolução científica, surgem também vários estudos com base em polímeros reforçados por materiais do grupo dos fosfatos e das cerâmicas.⁽⁸⁶⁻⁸⁹⁾ A combinação do colagénio e da nano-hidroxiapatite tem vindo a despertar a atenção dos investigadores na área da regeneração óssea como consequência da biocompatibilidade e das propriedades similares ao osso natural.⁽⁹⁰⁾ Os *scaffolds* provenientes desta combinação de materiais foram previamente caracterizados *in vitro* por *Rodrigues et al* em 2013. Os autores concluíram que as esponjas obtidas por criogelação são candidatas promissoras na reparação de defeitos ósseos. Os *scaffolds* biocompósitos de colagénio e nano-hidroxiapatite produzidos apresentaram boas propriedades mecânicas bem como maior taxa de adesão e proliferação celular relativamente aos *scaffolds* de colagénio.⁽⁶⁵⁾ Deste modo, na tentativa de

obter um material com maior poder osteoindutor e com função biomimética, no presente estudo, adicionou-se aos scaffolds de colagénio/nano-hidroxiapatite a fosfoserina, um aminoácido fosforilado com evidência científica da sua importância no estágio inicial da remodelação óssea resultando na formação de novo tecido ósseo.⁽⁴⁶⁾ A fosfoserina atua como componente funcional de algumas proteínas não colagenosas presentes na matriz extracelular, tais como a osteopontina (*OPN*) e sialoproteína óssea (*BSP*), responsáveis pelos processos de regulação nos osteoblastos, osteoclastos e mineralização da matriz óssea. Os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com incorporação de fosfoserina, descritos nesta dissertação, foram obtidos pela técnica da criogelação. Subsequentemente, as esponjas obtidas foram analisadas morfológica e físico-quimicamente através de várias técnicas, de modo a verificar se este aminoácido interfere ou não com a ligação formada pelas cadeias de colagénio com as partículas nanométricas de hidroxiapatite, o que poderia inviabilizar a sua aplicação como substitutos ósseos posteriormente (resultados apresentados previamente e discutidos mais abaixo). Não obstante, estudos *in vitro* com culturas celulares estão em decurso com o objetivo de clarificar o potencial osteoindutor da fosfoserina associado às propriedades benéficas do colagénio e da hidroxiapatite em Engenharia de Tecidos.

A análise realizada pela microscopia eletrónica por varrimento (SEM) apresenta resultados em que é possível observar uma morfologia heteroporosa em todos os *scaffolds* produzidos. Tal como descrito na literatura, a cristalização de água durante o processo de congelação preserva a ligação de EDC/NHS com as cadeias de colagénio através da formação de radicais livres por estes aditivos, durante o estado dissolvido, induzindo a reticulação.⁽⁶⁵⁾ Após secagem, são obtidos *scaffolds* com poros de estrutura tridimensional altamente interconectada, com tamanho e geometria variáveis como consequência do processo de cristalização da água. O requisito de poros de diferentes dimensões é imprescindível na obtenção de *scaffolds* pois permite a difusão de metabolitos, nutrientes e oxigénio para o interior da estrutura do biomaterial e viabiliza a adesão e proliferação celular.⁽⁹¹⁻⁹³⁾ Similarmente, a estrutura porosa favorece a osteointegração, a fixação e a estabilidade dos implantes ósseos após o procedimento cirúrgico.⁽⁹⁴⁾ A presença de partículas nanométricas de hidroxiapatite na superfície da estrutura das cadeias de colagénio, é passível de

observação nas imagens obtidas por SEM. Relativamente a este facto, é importante salientar que a hidroxiapatite tem influência na interação proteica (absorção e bioatividade) e adesão dos osteoblastos.^(95, 96) Para além disso, a hidroxiapatite está incluída nos materiais inorgânicos com maior aplicação na área da Medicina Dentária, como a regeneração periodontal, mais concretamente a regeneração de defeitos ósseos associados ao osso alveolar.⁽⁵⁷⁾ Segundo a literatura, tipicamente, os *scaffolds* devem conter macroporos mas também microporos (o diâmetro pode variar entre $1 < d < 300 \mu\text{m}$) como parte integrante das paredes que constituem os poros de maiores dimensões. De acordo com a classificação das ciências da vida, o tamanho dos poros pode ser $d_{\text{nano}} < 0.1 \mu\text{m}$, $0.1 < d_{\text{micro}} < 100 \mu\text{m}$, e $d_{\text{macro}} > 100 \mu\text{m}$ correspondendo a nano-, micro- e macroporos, respetivamente.^(67, 77) Contudo, a porosidade e o tamanho dos poros não devem ser admitidos como um valor padrão para as aplicações em regeneração óssea, em consequência das características ósseas *in vivo* e à diversidade de biomateriais, células e fatores solúveis (citoquinas, fatores de crescimento e hormonas) utilizadas *in vitro* e *in vivo*.⁽⁹⁴⁾ Os poros presentes nos *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina e na amostra controlo (sem fosfoserina), apresentam-se entre valores de 10 e 300 μm , atribuindo assim ao material em estudo propriedades de microporosidade e macroporosidade, respetivamente. Os diferentes tipos celulares requerem poros geometricamente distintos para a adesão, migração e proliferação celular devido à variedade de morfologia e tamanho entre si.⁽⁴³⁾ Os poros de tamanho menor são essenciais para as interações celulares, transferência de nutrientes, oxigénio e eliminação de metabolitos, enquanto poros com dimensões superiores são necessários para a proliferação celular do novo tecido ósseo.^(76, 77, 91) Inevitavelmente, a otimização da média do tamanho dos poros é um parâmetro de extrema importância na produção de *scaffolds* pois permite aumentar a taxa da osteogénese e subsequentemente a mineralização óssea.⁽⁴³⁾ Relativamente à geometria, nas amostras representativas dos *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com fosfoserina produzidos no presente estudo, existe uma deformação nos poros analisados pela SEM, isto é, as imagens obtidas apresentam uma gradual alteração da forma circular para uma forma elíptica, principalmente nos poros de maiores dimensões. Possivelmente, devido à

ligação do aminoácido às cadeias de colagénio, interferindo na reticulação entre as cadeias do mesmo. Contudo, a dimensão dos poros não é comprometida e como tal não afeta a porosidade total. Vários estudos têm sido realizados de modo a avaliar a potencialidade da porosidade dos *scaffolds* nas diferentes aplicações da engenharia de tecidos. Relativamente à influência da hidroxiapatite em *scaffolds* de materiais orgânicos, *Samandari* e colaboradores (2016), avaliaram o impacto deste material nos *scaffolds* de celulose/poliacrilamida. Os autores concluíram que o tamanho dos poros diminuiu em função do aumento da concentração de hidroxiapatite enquanto a percentagem de porosidade total aumentava.⁽³¹⁾ Com o objetivo de criar novos materiais para a regeneração de cartilagem, em 2013 *Jia et al.*, produziram *scaffolds* biocompósitos de colagénio e nano-hidroxiapatite e concluíram que através da cultura celular, os condrócitos não só aderiam às paredes do material bem como proliferavam rapidamente sem alterar a sua morfologia, capacitando os *scaffolds* porosos de colagénio e nano-hidroxiapatite para a regeneração do tecido cartilaginoso.⁽⁹⁷⁾ No ano seguinte, *Shevchenko et al.*(2014), produziram *scaffolds* de gelatina através da criogelação com o propósito de regeneração de feridas e concluíram que a estrutura macroporosa altamente organizada promove a migração, proliferação e distribuição de fibroblastos provando, assim que o material desenvolvido tem aptidão para a biointegração e remodelação inerentes ao processo de cicatrização.⁽⁷⁶⁾ Deste modo, é possível afirmar que o tamanho dos poros e a porosidade dos materiais são fatores determinantes para a sua utilização como *scaffolds* nas várias vertentes da engenharia de tecidos. Concluindo, os criogéis obtidos neste projeto apresentam características relativamente à porosidade, que são similares com estudos científicos previamente realizados.

A análise da FT-IR, de acordo com alguns autores, permite avaliar a interação química entre o colagénio e a hidroxiapatite.^(98, 99) Os resultados obtidos desta análise apresentam os picos relacionados com o colagénio e a hidroxiapatite em concordância com a literatura.^(99, 100) Os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com incorporação de fosfoserina apresentam uma alteração pouco significativa na intensidade do pico no comprimento de onda relativamente à banda da amida I (1550, 68 cm⁻¹). Similarmente *Sionkowska* e *Kozlowka* que em 2010 caracterizaram

biocompósitos de colagénio/hidroxiapatite (50:50) como substitutos ósseos, concluíram pela análise da FT-IR, que os resultados apresentam de igual forma uma alteração na banda da amida I após adição de hidroxiapatite.⁽¹⁰⁰⁾ A banda da amida I representa a ligação C=O e a alteração verificada deve-se provavelmente à interação do cálcio da hidroxiapatite com o colagénio. Em 2013, *Rodrigues et al.*, avaliaram a interação química do colagénio e da hidroxiapatite (50:50) e obtiveram igualmente uma alteração na banda da amida I.⁽⁶⁵⁾ Porém, as interações químicas entre a hidroxiapatite e os componentes orgânicos têm vindo a ser estudadas por vários autores, sugerindo hipoteticamente que estas interações ocorrem entre os iões cálcio e as cargas negativas dos grupos funcionais como a amida I e a amida II presentes na matriz orgânica dos biocompósitos estudados.⁽¹⁰¹⁾ Relativamente ao presente estudo, os resultados sugerem que os agregados nanométricos de hidroxiapatite podem ser ligados à estrutura do colagénio através da interação entre grupos carbonil e que o aminoácido osteoindutor adicionado neste estudo não interfere nesta interação nem compromete a união química do colagénio com a hidroxiapatite.⁽⁶⁵⁾

A presença de macroporos também influencia a quantidade de água absorvida, isto é, poros maiores apresentam maior capacidade de armazenar água e, conseqüentemente a retenção final de água no *scaffold* é maior.⁽¹⁰²⁾ Esta evidência científica pode ser hipoteticamente justificada em função das propriedades de superfície do material de interação com as moléculas de água, uma vez que o colagénio não se une quimicamente com a água.⁽¹⁰³⁾ Ainda assim, a capacidade de captar e armazenar água confere aos *scaffolds* a propriedade de absorver os fluidos orgânicos corporais, de transferir nutrientes, oxigénio e remover produtos resultantes do metabolismo celular. Geralmente, a captação de água aumenta o volume dos *scaffolds* resultando no aumento da superfície disponível para os processos de adesão e de infiltração celular. Todavia, o aumento da absorção de água também pode diminuir as propriedades mecânicas, provocar acumulação de forças no tecido circundante (“*shear stress*”) e por conseguinte, induzir a perda do implante.⁽¹⁰⁴⁾ Os *scaffolds* também têm elevada capacidade de captar proteínas e moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento) que são determinantes para a regulação da adesão e proliferação celular.⁽¹⁰⁴⁾ De acordo com os resultados obtidos, o equilíbrio de retenção de água é atingido aos 15 minutos. Este processo de difusão e de

captação de água dos *scaffolds* esponjosos ocorre devido à natureza do grupo hidrofílico presente na componente química deste material, pelo que este parâmetro é uma propriedade única dos hidrogéis e criogéis.⁽¹⁰⁵⁾ Todavia, a hidrofiliabilidade do colagénio confere aos *scaffolds* biocompósitos uma melhoria na proliferação celular e na adsorção proteica.⁽¹⁰¹⁾ Os biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite apresentam maior capacidade de retenção e armazenamento de água comparativamente ao seu peso inicial (amostra 1 – aumento de 13 vezes o peso inicial; amostra 2 – aumento de 23 vezes o peso inicial; amostra 3 – aumento de 29 vezes o peso inicial), sendo que para as amostras de colagénio/nano-hidroxiapatite com a adição de 1mg de fosfoserina (amostra 3), os *scaffolds* apresentam aproximadamente 30 vezes o seu tamanho inicial. Outro aspeto importante que influencia a captação de água é a presença dos cristais nanométricos de hidroxiapatite na matriz do colagénio. Estudos previamente realizados por *Rodrigues, et al.* em 2013, em que analisaram biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite em diferentes proporções, evidenciaram que quanto maior a concentração de cristais de hidroxiapatite, menor a capacidade de reter água.⁽⁶⁵⁾ Outro estudo previamente realizado por *Thain-Han e Misra* em 2009, reporta um decréscimo no nível de absorção de água após a adição dos agregados de nano-hidroxiapatite aos *scaffolds* de quitosano.⁽¹⁰⁶⁾ Não obstante, os resultados do teste da capacidade de solventes, permitem ainda concluir que a incorporação de diferentes concentrações de fosfoserina influencia a retenção de água, isto é, os *scaffolds* de colagénio/nano-hidroxiapatite com 5mg de fosfoserina (amostra 2) apresenta maior capacidade de captar água comparativamente com os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com 1 mg de fosfoserina (amostra 3) e com os *scaffolds* de colagénio/hidroxiapatite (amostra 1 - controlo) . Por outro lado, quando emergidas em *PBS*, as amostras 2 e 3 apresentam uma redução no coeficiente de absorção comparativamente com os *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite sem fosfoserina (amostra 1). Este facto pode ser explicado pelo decréscimo do número de macroporos comparativamente com o aumento do número de microporos resultantes da análise realizada pelas imagens obtidas por SEM.

Outro parâmetro importante para a implementação de *scaffolds* na Engenharia de Tecidos é o comportamento mecânico. Relativamente ao osso

natural, os materiais utilizados devem mimetizar o suporte mecânico quando submetidos às forças de tensão e compressão associadas ao ambiente *in vivo*.⁽¹⁰⁶⁾ Para além disso, idealmente, os *scaffolds* não requerem apenas propriedades mecânicas para exercer a função de matriz para albergar as células, mas também para o processo de sinalização molecular inerente à adesão, proliferação e metabolismo celulares.⁽²⁸⁾ Não obstante, e como referido anteriormente, as propriedades mecânicas dos *scaffolds* diminuem drasticamente com o aumento da porosidade.⁽²⁶⁾ O osso trabecular apresenta 75-85% de porosidade com poros de diâmetro compreendido entre 300-600 μm enquanto o osso cortical apresenta apenas 5-10% com poros de diâmetro incluídos no intervalo 10-50 μm .⁽¹⁰⁷⁾ No seu estado hidratado natural, o osso cortical tem uma força de compressão de 110-150 MPa e o módulo de elasticidade de 18-22GPa, sendo que para o osso trabecular a força de compressão é de 6MPa e o módulo de elasticidade é 0,1-0,3 GPa.⁽³¹⁾

No presente estudo, avaliou-se a resistência mecânica a ensaios cíclicos de compressão dos *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite com incorporação de fosfoserina hidratados, sob força dinâmico-mecânica de modo a mimetizar as condições fisiológicas *in vivo* após colocação do implante. O comportamento dinâmico-mecânico dos *scaffolds* foi caracterizado por *DMA* e o módulo de armazenamento (E') bem como o fator de perda (Tan delta) foram avaliados numa frequência 0,1 a 10 Hz. O módulo de armazenamento representa a componente elástica do material e indica a capacidade de armazenar energia durante o processo de deformação (resistência).⁽¹⁰⁸⁾ Os resultados obtidos pela análise de *DMA* reportam uma diminuição do E' com a incorporação da fosfoserina nos *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nano-hidroxiapatite promovendo a diminuição da resistência mecânica deste material, mas não significativamente. O fator de perda (Tan delta) corresponde à razão entre o módulo de energia armazenada (E') e o módulo de energia dissipada (E''), ambos conseguidos pela energia armazenada através da componente elástica do material e pelos mecanismos de viscosidade, respetivamente. Deste modo, o Tan delta fornece a informação necessária sobre as propriedades viscoelásticas do material.⁽¹⁰⁹⁾ Nos biocompósitos analisados, ocorre um aumento pouco significativo entre os *scaffolds* com diferentes concentrações de fosfoserina (amostra 2 e 3). No entanto relativamente aos *scaffolds* de colagénio/nano-

hidroxiapatite (amostra 1), a diferença é maior, pelo que as amostras 2 e 3 apresentam deformação visco-elástica, provavelmente associado à redução da resistência do material. A discrepância verificada pode ser explicada com a ligação da fosfoserina com o colagénio e aos cristais de hidroxiapatite presentes nos *scaffolds* biocompósitos descritos neste estudo. Por outro lado, hipoteticamente, a ligação do aminoácido fosforilado às cadeias do colagénio durante a reticulação do material pelo método de criogelação, reduz a qualidade de ligação entre as cadeias do polímero. A bibliografia disponível não apresenta estudos que solidifiquem a hipótese da fosfoserina interferir nos processos físico-químicos e na performance mecânica resultantes da combinação de colagénio/hidroxiapatite. Deste modo, o suporte científico é restrito. Porém, de acordo com a pesquisa realizada, um estudo conduzido por *Reinstorf et al.* (2004) para a avaliação da incorporação da fosfoserina no compósito de cimento ósseo de fosfato de cálcio, os autores concluíram que este aminoácido fosforilado aumenta as propriedades mecânicas, particularmente a força, mas inibe a dissolução de α -TCP (sistema de fosfato de tricálcio) alterando a morfologia dos cristais de hidroxiapatite recentemente formados.⁽³⁹⁾ Assim, são necessários mais ensaios laboratoriais para verificar o efeito da fosfoserina na ligação às fibras de colagénio e/ou aos aglomerados de nano-hidroxiapatite e consequentemente a sua potencial aplicação em Engenharia de Tecidos.

Conclusão

Conclusão

A presente monografia teve como principal objetivo produzir *scaffolds* biocompósitos de colagénio/nanohidroxiapatite com a incorporação de fosfoserina, através da técnica de criogelação. Os criogéis obtidos apresentaram uma estrutura altamente porosa com comportamento esponjoso, sendo que a presença do aminoácido em estudo não alterou significativamente a porosidade. Para além disso, os *scaffolds* produzidos, apresentam uma distribuição de poros com dimensão micrométrica e macrométrica, necessários aos mecanismos celulares inerentes à produção de novo tecido ósseo.

Os testes realizados para avaliar a resposta mecânica destes criogéis e a captação de solventes permitem ainda concluir que as propriedades viscoelásticas e o comportamento de captação e retenção de água, respetivamente, são favoráveis para os estudos *in vitro* que estão atualmente a decorrer, bem como para a aplicação dos *scaffolds* de colagénio/nanohidroxiapatite com fosfoserina à *posteriori in vivo*, nomeadamente na regeneração óssea.

Perspetivas futuras

Perspetivas futuras

O trabalho realizado e discutido na presente dissertação avaliou a influência física e mecânica do aminoácido fosforilado quando adicionado à conhecida estrutura tridimensional, produzida pelas ligações de colagénio e hidroxiapatite. Os testes realizados fornecem a informação preliminar necessária para a realização de outras avaliações, nomeadamente testes *in vitro* com linhas celulares similares ao tecido ósseo em decurso. Através dos testes *in vitro*, será possível entender o papel desempenhado pela fosfoserina em células idênticas a osteoblastos bem como avaliar a biocompatibilidade, biodegradação e o potencial osteoindutor do biomaterial. Deste modo, é necessária a caracterização destas esponjas com ensaios celulares para prever os possíveis mecanismos de integração com os tecidos após implementação destes materiais *in vivo*.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

1. Eslaminejad MB BF. Tissue Engineering Approach for Reconstructing Bone. *Yakhteh*. 2009;11:263-72.
2. Paiva KB, Granjeiro JM. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:74-87.
3. Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater*. 2014;10(9):3815-26.
4. Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(5):363-82.
5. Limb D. Bone – the tissue we work with. *Orthopaedics and Trauma*. 2015;29(4):223-7.
6. Jae-Young R, Liisa K-S, Peter Z. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering and Physics*. 1998;20:10.
7. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
8. Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*. 2015;33(1):1-6.
9. Maclaine S, Meek D, Brydone AS. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2010;224(12):1329-43.
10. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.

11. Wang T, Yang X, Qi X, Jiang C. Osteoinduction and proliferation of bone-marrow stromal cells in three-dimensional poly (epsilon-caprolactone)/hydroxyapatite/collagen scaffolds. *J Transl Med.* 2015;13:152.
12. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science.* 2005;310(5751):1135-8.
13. Kanczler JM, Oreffo, R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *European Cells and Materials.* 2008;15:100-14.
14. Gong T, Xie J, Liao J, Zhang T, Lin S, Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res.* 2015;3:15029.
15. Faingold A, Cohen SR, Reznikov N, Wagner HD. Osteonal lamellae elementary units: lamellar microstructure, curvature and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2013;9(4):5956-62.
16. Robling AG, Stout SD. Morphology of the Drifting Osteon. *Cells Tissues Organs.* 1999;164(4):192-204.
17. Mantoku A, Chatani M, Aono K, Inohaya K, Kudo A. Osteoblast and osteoclast behaviors in the turnover of attachment bones during medaka tooth replacement. *Dev Biol.* 2015:12.
18. Gentili CCR. Cartilage and Bone Extracellular Matrix. *Current Pharmaceutical Design.* 2009;15:1334-48.
19. Olczyk P, Mencner L, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *Biomed Res Int.* 2014;2014:747584.
20. Seeley. Rod; Stephens TT, Philipe. *Anatomia e Fisiologia.* 6^a ed: Lusociência; 2003.
21. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012;8(9):3191-200.
22. Frantz CSKaW, Valerie. The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science.* 2010;123:4195-200.

23. Shoulders MD, Raines RT. Collagen structure and stability. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:929-58.
24. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015:24.
25. Brinckmann J. Collagen as a glance. *Top Curr Chem.* 2005;247:1-6.
26. Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *Korean J Intern Med.* 2015;30(3):279-93.
27. Ma L. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(26):4833-41.
28. Davidenko N, Schuster CF, Bax DV, Raynal N, Farndale RW, Best SM, et al. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomater.* 2015;25:131-42.
29. Ryan AJ, Gleeson JP, Matsiko A, Thompson EM, O'Brien FJ. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *J Anat.* 2014:14.
30. Yang W, Han W, He W, Li J, Wang J, Feng H, et al. Surface topography of hydroxyapatite promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C.* 2016;60:45-53.
31. Saber-Samandari S, Saber-Samandari S, Ghonjizade-Samani F, Aghazadeh J, Sadeghi A. Bioactivity evaluation of novel nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering: The impact of hydroxyapatite. *Ceramics International.* 2016;42(9):11055-62.
32. Oliveira IR, Andrade TL, Araujo KCML, Luz AP, Pandolfelli VC. Hydroxyapatite synthesis and the benefits of its blend with calcium aluminate cement. *Ceramics International.* 2016;42(2):2542-9.
33. Stubinger S, Ghanaati S, Orth C, Hilbig U, Saldamli B, Biesterfeld S, et al. Maxillary sinus grafting with a nano-structured biomaterial: preliminary clinical and histological results. *Eur Surg Res.* 2009;42(3):143-9.

34. Kolmas J, Krukowski S, Laskus A, Jurkitewicz M. Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications. *Ceramics International*. 2016;42(2):2472-87.
35. Shakib K, Tan A, Soskic V, Seifalian AM. Regenerative nanotechnology in oral and maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2014;52(10):884-93.
36. Leilei Z, Hejun L, Kezhi L, Shoujie L, Yulei Z, Pei Y, et al. Multi-layer SiC/Mg and F co-substituted hydroxyapatite/chitosan bioactive coating for carbon fibers. *Materials Letters*. 2016;164:360-3.
37. Hannora AE, Ataya S. Structure and compression strength of hydroxyapatite/titania nanocomposites formed by high energy ball milling. *Journal of Alloys and Compounds*. 2016;658:222-33.
38. Nudelman F, Lausch AJ, Sommerdijk NA, Sone ED. In vitro models of collagen biomineralization. *J Struct Biol*. 2013;183(2):258-69.
39. Reinstorf A. RM, Gelinsky M., Pompe W. Phosphoserine- a convenient compound for modification of calcium phosphate bone cement collagen composites. *Journal of Materials Science*. 2004;15:451-5.
40. Semino CE. Self-assembling Peptides: From Bio-inspired Materials to Bone Regeneration. *Journal of Dental Research*. 2008;87(7):606-16.
41. Ying X, Chen X, Cheng S, Guo X, Chen H, Xu HZ. Phosphoserine promotes osteogenic differentiation of human adipose stromal cells through bone morphogenetic protein signalling. *Cell Biol Int*. 2014;38(3):309-17.
42. Goldberg HJW, Kevin; Graem, Michael C.Li; Hunter, K. . Binding of bone sialoprotein, osteopontin and synthetic polypeptides to hydroxyapatite. *Connective Tissue Research*. 2001;42:25-37.
43. Schneiders W, Reinstorf A, Pompe W, Grass R, Biewener A, Holch M, et al. Effect of modification of hydroxyapatite/collagen composites with sodium citrate, phosphoserine, phosphoserine/RGD-peptide and calcium carbonate on bone remodelling. *Bone*. 2007;40(4):1048-59.
44. Cartmell S. Controlled release scaffolds for bone tissue engineering. *J Pharm Sci*. 2009;98(2):430-41.

45. Galli C, Piemontese M, Meikle ST, Santin M, Macaluso GM, Passeri G. Biomimetic coating with phosphoserine-tethered poly(epsilon-lysine) dendrons on titanium surfaces enhances Wnt and osteoblastic differentiation. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(2):e133-9.
46. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol.* 2010;47(1):1-4.
47. Wen X, Shi D, Zhang N. Applications of nanotechnology in tissue engineering: American Scientific Publishers; 2005. 22 p.
48. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;65:20-31.
49. Burr DB. The complex relationship between bone remodeling and the physical and material properties of bone. *Osteoporos Int.* 2015;26(3):845-7.
50. Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2014;100(1 Suppl):S107-12.
51. Matsumoto T, Imura T, Ogura K, Moriyama K, Yamaguchi A. The role of osteocytes in bone resorption during orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2013;92(4):340-5.
52. Huang H, Williams RC, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2014;146(5):620-32.
53. Tripuwabhrut P, Mustafa M, Gjerde CG, Brudvik P, Mustafa K. Effect of compressive force on human osteoblast-like cells and bone remodelling: an in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2013;58(7):826-36.
54. Brown A, Zaky S, Ray H, Jr., Sfeir C. Porous magnesium/PLGA composite scaffolds for enhanced bone regeneration following tooth extraction. *Acta Biomater.* 2015;11:543-53.
55. Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone.* 2015;81:112-21.

56. Elsalanty ME, Genecov DG. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.* 2009;2(3):125-34.
57. Shimauchi H, Nemoto E, Ishihata H, Shimomura M. Possible functional scaffolds for periodontal regeneration. *Japanese Dental Science Review.* 2013;49(4):118-30.
58. Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes & Diseases.* 2015:16.
59. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S20-7.
60. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(10):2445-61.
61. Christoph A, Ramseier, Rasperini G, Batia S, Giannobile WV. Advanced reconstructive technologies for periodontal tissue repair. *Periodontology* 2000. 2012;59:7.
62. Sampogna G, Guraya SY, Forgione A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure.* 2015;3(3):101-7.
63. Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater.* 2016;30:1-12.
64. Hassan MN, Mahmoud MM, El-Fattah AA, Kandil S. Microwave-assisted preparation of Nano-hydroxyapatite for bone substitutes. *Ceramics International.* 2016;42(3):3725-44.
65. Rodrigues SC, Salgado CL, Sahu A, Garcia MP, Fernandes MH, Monteiro FJ. Preparation and characterization of collagen-nanohydroxyapatite biocomposite scaffolds by cryogelation method for bone tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101(4):1080-94.

66. Ling LE, Feng L, Liu HC, Wang DS, Shi ZP, Wang JC, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(5):1732-45.
67. Venkatesan J, Kim S-K. Nano-Hydroxyapatite Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering—A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2014;10(10):3124-40.
68. Kim HL, Jung GY, Yoon JH, Han JS, Park YJ, Kim DG, et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;54:20-5.
69. Offeddu GS, Ashworth JC, Cameron RE, Oyen ML. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2015;42:19-25.
70. Yavuz H, Denizli A. A New Affinity Separation Medium: Supermacroporous Cryogels. 2015.
71. Kirsebom H, Mattiasson B. Cryostructuring as a tool for preparing highly porous polymer materials. *Polymer Chemistry*. 2011;2(5):1059.
72. Plieva FM, Galaev IY, Mattiasson B. Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications. *J Sep Sci*. 2007;30(11):1657-71.
73. Kathuria N, Tripathi A, Kar KK, Kumar A. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(1):406-18.
74. Pawelec KM, Husmann A, Best SM, Cameron RE. Understanding anisotropy and architecture in ice-templated biopolymer scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014;37:141-7.
75. Chang KH, Liao HT, Chen JP. Preparation and characterization of gelatin/hyaluronic acid cryogels for adipose tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Acta Biomater*. 2013;9(11):9012-26.

76. Shevchenko RV, Eeman M, Rowshanravan B, Allan IU, Savina IN, Illsley M, et al. The in vitro characterization of a gelatin scaffold, prepared by cryogelation and assessed in vivo as a dermal replacement in wound repair. *Acta Biomater.* 2014;10(7):3156-66.
77. Gun'ko VM, Savina IN, Mikhalovsky SV. Cryogels: morphological, structural and adsorption characterisation. *Adv Colloid Interface Sci.* 2013;187-188:1-46.
78. Mu C, Liu F, Cheng Q, Li H, Wu B, Zhang G, et al. Collagen Cryogel Cross-Linked by Dialdehyde Starch. *Macromolecular Materials and Engineering.* 2010:NA-NA.
79. Gupte MJ, Ma PX. Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res.* 2012;91(3):227-34.
80. Jain E, Damania A, Shakya AK, Kumar A, Sarin SK, Kumar A. Fabrication of macroporous cryogels as potential hepatocyte carriers for bioartificial liver support. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;136:761-71.
81. Bencherif SA, Braschler TM, Renaud P. Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *J Periodontal Implant Sci.* 2013;43(6):251-61.
82. Zheng L, Yang F, Shen H, Hu X, Mochizuki C, Sato M, et al. The effect of composition of calcium phosphate composite scaffolds on the formation of tooth tissue from human dental pulp stem cells. *Biomaterials.* 2011;32(29):7053-9.
83. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dent Mater.* 2015;31(4):317-38.
84. Kinikoglu B, Damour O, Hasirci V. Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin. *J Artif Organs.* 2015;18(1):8-19.
85. Newbury DE, Ritchie NW. Is scanning electron microscopy/energy dispersive X-ray spectrometry (SEM/EDS) quantitative? *Scanning.* 2013;35(3):141-68.

86. Kane RJ, Weiss-Bilka HE, Meagher MJ, Liu Y, Gargac JA, Niebur GL, et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2015;17:16-25.
87. Quinlan E, Partap S, Azevedo MM, Jell G, Stevens MM, O'Brien FJ. Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair. *Biomaterials.* 2015;52:358-66.
88. Yazdimamaghani M, Razavi M, Vashae D, Pothineni VR, Assefa S, Köhler GA, et al. In vitro analysis of Mg scaffolds coated with polymer/hydrogel/ceramic composite layers. *Surface and Coatings Technology.* 2016:7.
89. Sharifi E, Azami M, Kajbafzadeh AM, Moztafzadeh F, Faridi-Majidi R, Shamousi A, et al. Preparation of a biomimetic composite scaffold from gelatin/collagen and bioactive glass fibers for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;59:533-41.
90. Fikai A, Andronescu E, Trandafir V, Ghitulica C, Voicu G. Collagen/hydroxyapatite composite obtained by electric field orientation. *Materials Letters.* 2010;64(4):541-4.
91. Idaszek J, Kijeńska E, Łojkowski M, Swieszkowski W. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine. *Applied Surface Science.* 2016.
92. Correia DM, Ribeiro C, Sencadas V, Vikingsson L, Oliver Gasch M, Gómez Ribelles JL, et al. Strategies for the development of three dimensional scaffolds from piezoelectric poly(vinylidene fluoride). *Materials & Design.* 2016;92:674-81.
93. Lemaire T, Pham TT, Capiez-Lernout E, de Leeuw NH, Naili S. Water in hydroxyapatite nanopores: Possible implications for interstitial bone fluid flow. *J Biomech.* 2015;48(12):3066-71.
94. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005;26(27):5474-91.

95. Ghomi H, Fathi MH, Edris H. Preparation of nanostructure hydroxyapatite scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2011;58(3):642-50.
96. Motamedian SR, Hosseinpour S, Ahsaie MG, Khojasteh A. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. *World J Stem Cells*. 2015;7(3):657-68.
97. Jia L, Duan Z, Fan D, Mi Y, Hui J, Chang L. Human-like collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds for the culture of chondrocytes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(2):727-34.
98. Pelin IM, Maier SS, Chitanu GC, Bulacovschi V. Preparation and characterization of a hydroxyapatite–collagen composite as component for injectable bone substitute. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(7):2188-94.
99. León-Mancilla BH, Araiza-Téllez MA, Flores-Flores JO, Piña-Barba MC. Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology*. 2016;14(1):77-85.
100. Sionkowska A, Kozłowska J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *Int J Biol Macromol*. 2010;47(4):483-7.
101. Lima PA, Resende CX, Soares GD, Anselme K, Almeida LE. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(6):3389-95.
102. Nieto-Suarez M, Lopez-Quintela MA, Lazzari M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydr Polym*. 2016;141:175-83.
103. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:18-23.

104. Sowjanya JA, Singh J, Mohita T, Sarvanan S, Moorthi A, Srinivasan N, et al. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;109:294-300.
105. Sudarsan S, Franklin DS, Sakthivel M, Guhanathan S. Non toxic, antibacterial, biodegradable hydrogels with pH-stimuli sensitivity: Investigation of swelling parameters. *Carbohydrate Polymers*. 2016;148:206-15.
106. Thein-Han WW, Misra RD. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(4):1182-97.
107. Chen PY, McKittrick J. Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4(7):961-73.
108. Torres F, Nazhat S, Sheikhmdfadzullah S, Maquet V, Boccaccini A. Mechanical properties and bioactivity of porous PLGA/TiO₂ nanoparticle-filled composites for tissue engineering scaffolds. *Composites Science and Technology*. 2007;67(6):1139-47.
109. Santawisuk W, Kanchanavasita W, Sirisinha C, Harnirattisai C. Dynamic viscoelastic properties of experimental silicone soft lining materials. *Dental Materials Journal*. 2010;29(4):454-60.