



Universidade de Aveiro Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

2018

Carla Patrícia **Otimização do processo de fabricação e sementeação de scaffolds**
Cravid Fernandes **de PCL/Gelatina anisotrópicos para a engenharia de**
cartilagem



Carla Patrícia

Cravid Fernandes

Otimização do processo de fabricação e sementeação de scaffolds de PCL/Gelatina anisotrópicos para a engenharia de cartilagem

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica do Doutor António Manuel Godinho Completo, Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques, equiparada a Investigadora Principal no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

O autor gostaria de agradecer os projetos: POCI-01-0145-FEDER-016574, PTDC/EMS-TEC/3263/2014 e POCI-01-0145-FEDER-028424 suportados pelos orçamentos dos Programas Operacional Competitividade e Internacionalização (COMPETE 2020) na sua componente FEDER e pelo orçamento da Fundação para a Ciência e a Tecnologia na sua componente OE.

O Júri

Presidente Prof. Doutor Rui Ramos Ferreira e Silva

Professor associado da Universidade de Aveiro e Diretor do Departamento de Engenharia Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Prof.Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes

Professora Associada do Departamento de Engenharia Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro

Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques

Investigadora Principal no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar, o meu mais sincero obrigado ao professor Doutor António Completo e à Professora Doutora Paula Marques pela oportunidade de fazer parte deste projeto. Agradeço ainda pela confiança depositada e toda a orientação prestada durante a execução desta dissertação.

À Ângela Semitela, elemento integrante do grupo TEMA (Centro de Tecnologia Mecânica e Automação), o meu mais sincero reconhecimento pela extrema atenção, dedicação e acompanhamento durante toda a realização deste trabalho. Aos restantes membros do TEMA em especial ao André Girão, Susana Pinto, Nuno Almeida e Gonçalo Ramalho, obrigada pela atenção e ajuda prestada em todos os momentos necessários, bem como pela criação de um ambiente motivador e que apela ao gosto pela investigação.

À Dayana Gúzman e Joana Gonçalves (as ovelhas negras), obrigada pela vossa amizade - tenho a certeza de que sem vocês estes dois anos não teriam sido tão divertidos. Terei saudades!

Ao grupo Afrodance, obrigada pelas horas energéticas e de puro convívio. Foram de facto uma fonte inesgotável de energia, tão necessária para manter a boa disposição e o foco ao longo dos trabalhos académicos.

E porque os últimos são os primeiros, agradeço a minha família pelo esforço, apoio e compreensão nas diferentes etapas do meu percurso pessoal e académico, em particular ao longo do mestrado. Agradeço também pela constante motivação e confiança depositada. Este trabalho é tão meu quanto vosso.

Ao futuro da ciência.

Resumo

O tratamento de lesões da cartilagem articular constitui um desafio para a medicina regenerativa. Nesse âmbito, a engenharia de tecidos tem-se debruçado sobre o desenvolvimento de métodos que visam alcançar resultados mais aprimorados. Para tal, são várias as abordagens possíveis, destacando-se por exemplo, o método de sementeação de células em estruturas tridimensionais porosas (*scaffolds*).

Com este trabalho pretendeu-se otimizar o processo de fabricação e de sementeação de células em *scaffolds*. As técnicas de sementeação selecionadas (compressão, *top and bottom* e injeção) para o estudo foram desenvolvidas e testadas em laboratório envolvendo células da cartilagem (condrócitos), *scaffolds* anisotrópicos de Policaprolactona/Gelatina/Polietilenoglicol (PCL/Gelatina/PEG) e materiais que permitiram a criação de um ambiente propício ao desenvolvimento do tecido cartilagíneo. A validação dos resultados (aferição do nível de otimização) foi realizada por meio de testes celulares e mecânicos. Com base nos resultados, conclui-se que a incorporação de PEG seguida da sua remoção permitiu aumentar a porosidade das estruturas porosas, permitindo assim, a incorporação bem como a difusão das células entre as camadas. A incorporação de células por compressão foi a que apresentou valores de viabilidade celular mais elevados para todos os *scaffolds* com exceção dos *scaffolds* constituídos pelas camadas intermédia e profunda cujos os valores de viabilidade celular foram mais elevados para a técnica *top and bottom*. O estudo efetuado, sustentado por resultados laboratoriais, permite concluir que a presença de células nas estruturas anisotrópicas confirma a atividade metabólica das mesmas pelo ensaio com resazurina, bem como a sua difusão e distribuição ao longo das arquiteturas avaliadas.

Palavras-Chave

Cartilagem Articular; Scaffolds de PCL/Gelatina/PEG; Sementeação Celular Estática

Optimization of the manufacturing and seeding process of anisotropic PCL/Gelatin scaffolds for cartilage engineering

Abstract

The treatment of joint cartilage lesions is a challenge for regenerative medicine. In this context, tissue engineering has focused on the development of methods aimed at achieving better results. In order to do so, several possible approaches are outlined, for example, the method of cell seeding in three-dimensional porous structures (scaffolds).

The aim of this work was to optimize the process of manufacturing and seeding cells in scaffolds. The selected seeding techniques (compression, top and bottom and injection) for the study were developed and tested in the laboratory involving cartilage cells (chondrocytes), anisotropic polycaprolactone/gelatine/polyethylene glycol (PCL/gelatine/PEG) scaffolds and materials that allowed the creation of an environment conducive to the development of cartilage tissue. The validation of the results (calibration of the level of optimization) was performed through cellular and mechanical tests. Based on the results, it was concluded that the incorporation of PEG followed by its removal allowed to increase the porosity of the porous structures, thus allowing the incorporation as well as the diffusion of the cells between the layers. The incorporation of cells by compression showed the highest cell viability values for all architectures except for the architecture composed by the intermediate and deep layers whose values of cell viability were higher for the top and bottom technique.

The study, supported by laboratory results, allows us to conclude that the presence of cells in the anisotropic structures confirms their metabolic activity by the resazurin assay, as well as its diffusion and distribution throughout the architectures evaluated.

Keywords

Articular Cartilage, PCL/Gelatine/PEG Scaffolds, Static Cell Seeding

Glossário

ATR-FTIR – Espetroscopia no Infravermelho com refletância total atenuada

CA – Cartilagem Articular

ET – Engenharia de Tecidos

GO – Óxido de Grafeno

MEC – Matriz Extracelular

PCL – Policaprolactona

PEG – Polietilenoglicol

PG – Proteoglicanos

SEM – Microscópio Eletrônico de Varrimento

3D – Tridimensional

Índice de Matérias

Agradecimentos.....	IV
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Glossário.....	VIII
Índice de Matérias.....	IX
Índice de Tabelas.....	XI
Índice de Figuras.....	XII
1 - INTRODUÇÃO.....	14
2 - CARTILAGEM ARTICULAR.....	17
2.1. Elementos da matriz extracelular.....	17
2.2. Organização estrutural.....	20
2.3. Comportamento mecânico.....	22
2.4. Lesões da cartilagem.....	23
2.5. Engenharia de tecidos para cartilagem.....	24
2.5.1. Biomaterial.....	25
2.5.2. Técnica de produção - <i>electrospinning</i>	26
2.5.3. Semeação de células.....	31
2.5.3.1. Semeação estática por Pipetagem/Injeção.....	32
2.5.3.2. Semeação estática por Compressão.....	32
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Fabricação de malhas de PCL/GEL.....	34
3.1.1. Otimização das malhas de PCL/Gelatina.....	37
3.1.2. Montagem das malhas.....	37
3.2. Caracterização das malhas PCL/Gelatina.....	39
3.3. Caracterização dos <i>scaffolds</i>	41
3.4. Semeação celular (<i>Cell seeding</i>).....	42
a) <i>Expansão celular</i>	42
b) <i>Incorporação das células</i>	42
3.4.1. Viabilidade celular.....	43

3.4.2. Distribuição das células ao longo dos <i>scaffolds</i>	44
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Otimização da malha.....	45
4.2. Caracterização da malha	47
4.2.3. Análise química.....	47
4.2.1. Ângulos de contacto.....	48
4.2.2. Ensaio mecânico de Tração.....	49
4.3. Caracterização dos <i>scaffolds</i>	52
4.3.1. Turgescência dos <i>scaffolds</i>	52
4.3.2. Ensaio mecânico de compressão	54
4.4. Atividade celular	55
4.5. Distribuição das células.....	57
5 - CONCLUSÃO E DESENVOLVIMENTOS FUTUROS	65
BIBLIOGRAFIA.....	67

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Parâmetros do electrospinning para a produção das malhas de PCL/Gelatina.....	35
Tabela 3.2. Representação das pesagens dos scaffolds secos ao ar e com papel de filtro.....	43
Tabela 4.1. Diâmetro médio dos poros e das fibras das camadas superficial, intermédia e profunda.	47
Tabela 4.2. Módulo de elasticidade e deformação das malhas no estudo de seco e molhado.....	52

Índice de Figuras

Figura 2.1. Representação esquemática dos proteoglicanos (adaptado de [29]).	18
Figura 2.2. Representação das fibras de colagénio e agregados de proteoglicanos [22].	19
Figura 2.3. Organização estrutural dos condrócitos (esquerda) e das fibras de colagénio (direita) na CA (adaptado de [51]).	20
Figura 2.4. Representação esquemática do Electrospinning (adaptado de [90]).	27
Figura 2.5. Ilustração da organização zonal da cartilagem articular em scaffold de PCL (adaptado de [1]).	28
Figura 2.6. Representação esquemática de scaffold anisotrópico de PCL. (adaptado de [50]).	29
Figura 2.7. A) Membrana de PCL/Gelatina (7mm de diâmetro); B) Condrócitos na malha de PCL/Gelatina após 3 dias de sementeação in vitro (adaptado de [97]).	30
Figura 2.8. A) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (30:70); B) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (50:50) e C) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (70:30) (adaptado de [101]).	30
Figura 2.9. a) Células em scaffold à base de PCL/Gelatina ; b) Células em scaffold à base de PCL (adaptado de [84]).	31
Figura 2. 10. Representação esquemática da sementeação celular estática (adaptado de [17] e [18]).	32
Figura 2.11. Representação esquemática da sementeação celular por compressão (adaptado de [17]).	33
Figura 3.1. Ilustração dos processos de electrospinning aplicados na produção das camadas dos scaffolds: a) Co-electrospinning de PCL/Gelatina/PEG para as zonas superficial e profunda; b) Wet-electrospinning de PCL/ Gelatina para na zona intermédia.	36
Figura 3.2. Representação esquemática das diferentes arquiteturas dos scaffolds desenvolvidos.	36
Figura 3.3. Cortes das malhas para as camadas profunda (esquerda), superficial (centro) e as malhas produzidas por electrospinning (direita).	37
Figura 3.4. Montagem das camadas em moldes (5x5mm) e estruturas obtidas do congelamento	38
Figura 3.5. a) Moldes (10x5 mm); b) Scaffolds anisotrópicos resultantes da liofilização de PCL/Gelatina em hidrogéis de GO-colagénio.	39
Figura 3.6. Representação do sistema de medição do ângulo de contacto - OCA 20 da Dataphysics (esquerda) (adaptado de [108]) e deposição de uma gota de água sobre a malha de PCL/Gelatina/PEG (direita).	40

Figura 3.7. Ilustração da elongação de uma malha PCL/Gelatina/PEG pelo sistema Shimadzu MMT- 101N.....	40
Figura 3. 8. Ilustração da compressão de scaffolds de PCL/Gelatina pelo sistema Shimadzu MMT- 101N.....	41
Figura 4.1. Imagens de SEM das malhas de PCL/Gelatina para as camadas superficial e profunda: A) Malha PCL/Gelatina com partículas de PEG; B) Malha de PCL/Gelatina após a remoção de PEG.....	46
Figura 4.2. Imagem de SEM da malha de PCL/Gelatina obtida por wet-electrospinning para a camada intermédia.	47
Figura 4.6. ATR-FTIR das malhas de PCL/Gelatina, PCL/Gelatina/PEG.....	48
Figura 4.3. Representação gráfica dos ângulos de contacto das malhas de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG. A significância estatística é indicada por um asterisco para (* $p < 0.5$).....	49
Figura 4.4. Representação gráfica das curvas de tensão-deformação da malha de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG secas.	50
Figura 4.5. Representação gráfica das curvas de tensão- deformação da malha de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG molhadas.	51
Figura 4.7. Representação gráfica de taxa de turgescência dos scaffolds.	53
Figura 4.8. Módulos de compressão das estruturas anisotrópicas (H1, H2, H3 e H4).....	54
Figura 4.9. Representação gráfica da viabilidade celular nas diferentes arquiteturas (H1, H2, H3 e H4) no 1° (A), 3° (B), 7° (C), 14° (D) e 21° (F) dia após a semente celular. A significância estatística é indicada por um asterisco para (* $p < 0.5$).....	57
Figura 4.10. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H1 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, Top and bottom e Injeção).....	59
Figura 4.11. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H2 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, Top and bottom e Injeção).....	61
Figura 4.12. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H3 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, Top and bottom e Injeção).....	62
Figura 4.13. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H4 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, Top and bottom e Injeção).....	63

1 - INTRODUÇÃO

Enquadramento

A cartilagem articular (CA) é um tecido altamente especializado, que exhibe propriedades mecânicas anisotrópicas, como resultado da sua organização estrutural que varia com a profundidade [1]. Com base nessas propriedades, a cartilagem articular constitui uma estrutura flexível e resistente às cargas aplicadas. Por ser um tecido avascular, a capacidade de regeneração do tecido cartilágneo é limitada [2-4]. Essa situação que pode conduzir à degeneração da cartilagem em casos de lesão, condiciona não apenas o normal funcionamento da cartilagem articular como também dos tecidos circundantes - culminando na limitação do movimento articular.

Atualmente, os métodos aplicados para o tratamento de lesões da cartilagem passam sobretudo por processos cirúrgicos (como microfratura, transplante de enxertos osteocondrais, implantação de próteses, etc.) e/ou o uso de fármacos [4],6]. No entanto, tais métodos podem acarretar efeitos secundários para o paciente (rejeição no caso das próteses, formação de fibrocartilagem no caso de microfratura, etc.) [7-9]. Essa situação, que por si só constitui uma limitação, tem conduzido ao desenvolvimento de estratégias que visam regenerar a cartilagem articular, nomeadamente o crescimento de tecido cartilágneo em estruturas tridimensionais porosas (*scaffolds*), e a posterior implantação no local afetado [8]-[9]. Na prática, estas estruturas (*scaffolds*), ao serem arquitetonicamente semelhantes a matriz extracelular nativa (MEC) proporcionam um microambiente biomimético favorável à adesão, proliferação e crescimento do tecido cartilágneo [10][11].

O *electrospinning* tem sido uma das técnicas usadas em engenharia de tecidos (ET) na produção de *scaffolds* [13,14]. Através desta técnica são produzidas fibras do biomaterial, capazes de imitar em estrutura e dimensão as fibras de colagénio da matriz extracelular nativa do tecido cartilágneo [11]. Contudo, a natureza do *scaffold* não é único aspeto a se considerar durante o desenvolvimento de um tecido, sendo o processo de sementeção celular também determinante na formação do tecido.

O processo de sementeção celular consiste na cultura de células na matriz porosa, através da aplicação de técnicas de sementeção [13], que permitem a incorporação das células na estrutura porosa. Estas técnicas de sementeção de células em *scaffolds* visam : i) uma distribuição celular uniforme, ii) alta eficiência durante o processo de sementeção, iii) tempo de sementeção reduzido e iv) alta reprodutibilidade [8]. Ainda que sejam inúmeros os estudos sobre as técnicas de sementeção de células [16-15]18], estas apresentam certas limitações que vão desde a distribuição não

uniforme das células nas estruturas porosas; tempo de sementeção elevado; ou mesmo a complexidade na execução da técnica [13]. E para que o processo de sementeção seja clinicamente aplicável, é essencial a difusão e distribuição uniforme das células por toda a estrutura porosa; é preferível também a utilização de técnicas e dispositivos simples e o mesmo deve ser concluído em um curto espaço de tempo e de forma eficiente [17]. É tendo em conta essas limitações, que este trabalho vem precisamente debruçar um novo olhar sobre os processos de incorporação das células nas estruturas porosas, tendo sempre em especial atenção a natureza do *scaffold* sobre o qual será efetuada a sementeção de células, visando desta forma, o desenvolvimento de um tecido mecanicamente e biologicamente semelhante ao tecido articular nativo.

Objetivos

Este trabalho, inserido no projeto Arcadelike – Desenvolvimento da arquitetura fisiológica da cartilagem desenvolvida *in-vitro* por combinação de estímulo mecânico e *scaffolds* fibrosos anisotrópicos em biorreator” (ref. PTDC/SEM-TEG/3263/2014), vai de encontro aos objetivos estipulados pelo próprio projeto, que incluem o desenvolvimento de *scaffolds* anisotrópicos fibrosos de PCL, com diferentes tamanhos e orientação das fibras, e a sua caracterização estrutural e biológica em ambientes estático e dinâmico. Trabalho já desenvolvido no âmbito deste projeto demonstrou que a porosidade inerente dos *scaffolds* desenvolvidos dificulta de certo modo a migração celular, o que por sua vez, compromete a formação de um tecido funcional [18]. Surge então a necessidade de solucionar esta situação e é neste ponto que se insere este trabalho. Pretende-se otimizar o processo de fabricação e sementeção de células da cartilagem em estruturas 3D produzidas por electrospinning, através da variação de parâmetros como:

- propriedades dos *scaffolds* (nomeadamente porosidade, topografia e propriedades mecânicas);
- técnicas de sementeção celular estática na matriz porosa.

Organização da dissertação

A dissertação encontra-se organizada em cinco capítulos incluindo esta introdução.

O primeiro capítulo é integralmente dedicado à apresentação do cenário em foco e do problema concreto em estudo. No segundo capítulo é feita uma revisão da literatura relacionada com o tema cartilagem articular. Nesse capítulo são também abordados aspetos relevantes acerca da engenharia de tecidos aplicada à CA, nomeadamente os biomateriais usados (PCL e Gelatina), a técnica de produção das estruturas tridimensionais e as técnicas de sementeção de células adotadas para este trabalho.

As metodologias propostas são apresentadas no terceiro capítulo e no quarto é feita a análise ao alcance e validade das mesmas. Finalmente, o quinto capítulo é reservado ao balanço e conclusões globais, havendo ainda lugar para perspetivar desenvolvimentos futuros.

Fazem ainda parte desta dissertação um anexo com a versão digital da dissertação.

2 - CARTILAGEM ARTICULAR

A cartilagem articular é um tecido conjuntivo fundamental nas articulações sinoviais (joelho, anca, tornozelo, por exemplo) [7]. É composta por um pequeno número de células (condrócitos) – cerca de 1-10% do volume total do tecido – localizadas numa matriz extracelular constituída principalmente por água e macromoléculas como colagénio e proteoglicanos [21,22].

Os condrócitos são células especializadas, responsáveis pela produção de proteínas que constituem a matriz celular bem como das citocinas e enzimas (metaloproteinasas) capazes de destruir a matriz [21]. Assim, pode afirmar-se que a produção, organização e manutenção da matriz extracelular é assegurada e controlada pela atividade celular dos condrócitos, e que as propriedades (estrutural e mecânica) da cartilagem articular dependem da interação entre os condrócitos e a matriz extracelular [24,25]. No entanto, a interação entre a matriz e os condrócitos e as propriedades que resultam desta variam de acordo com a zona da matriz [24]. Esta heterogeneidade da matriz cartilágnea deve-se à disposição diferencial dos condrócitos que variam em número, tamanho e forma ao longo da matriz, refletindo numa constituição e organização também diferencial da matriz e dos seus elementos[26,27].

Classificada como uma estrutura bifásica, a matriz cartilágnea é formada por uma fase sólida e uma líquida que juntas, determinam as propriedades mecânicas da cartilagem [28,29]. A fase líquida da matriz é constituída maioritariamente por água (equivalente a 60-85% do seu peso) e por diversas macromoléculas que compõem a fase sólida [28]. A fase sólida contém os condrócitos e uma matriz rica em proteoglicanos(4-7% em volume) e fibras de colagénio tipo II (15-22% em volume) [20].

2.1. Elementos da matriz extracelular

Água

A água, enquanto componente mais abundante da cartilagem articular, contribui em grande parte para o seu peso húmido. Aproximadamente 30% da água está dentro das fibras de colagénio e os restantes 70% são retidos pelos proteoglicanos [31,32].

Os iões inorgânicos como o sódio, cálcio, cloreto e potássio também estão dissolvidos na água, compondo o fluído ou líquido intersticial [31]. O fluxo do fluído intersticial através da matriz ajuda a transportar e distribuir nutrientes até aos condrócitos, remover catabólitos, lubrificar a superfície articular e suportar as cargas aplicadas na articulação [34,35]. Esta capacidade da cartilagem de absorver as tensões exercidas (mais de 90%), advém da interação da água com as macromoléculas da matriz, nomeadamente os proteoglicanos [36-38]. E isto

porque, perante uma tensão de compressão, a água retida pelas macromoléculas dissipa as cargas à medida que esta é movida através da matriz [25]. Este feito mecânico que é conseguido devido à resistência da água (fluido intersticial) ao movimento, é criado pela baixa permeabilidade hidráulica da matriz extracelular e permite ao tecido articular suportar cargas muitas vezes superiores ao peso corporal [31],39].

Proteoglicanos

Os proteoglicanos (PG) são cadeias de glicosaminoglicanos ligadas a uma proteína central [37]. Estas glicoproteínas não se limitam apenas a atrair moléculas de água para o interior da matriz cartilágnea preenchendo os espaços da mesma, como também conferem propriedades mecânicas únicas à matriz cartilágnea, como rigidez e a capacidade de resistir às cargas de compressão [31] [38].

Os glicosaminoglicanos (GAG) são estruturas polissacarídicas que possuem uma elevada quantidade de carga negativa e, como resultado atraem uma nuvem de cátions, sendo o mais atraído o sódio que “arrasta” consigo moléculas de água (Figura 2.1), que não só hidratam o tecido como também aumentam a pressão osmótica da estrutura, resultando num aumento da resistência do tecido à compressão [4, 36,42].

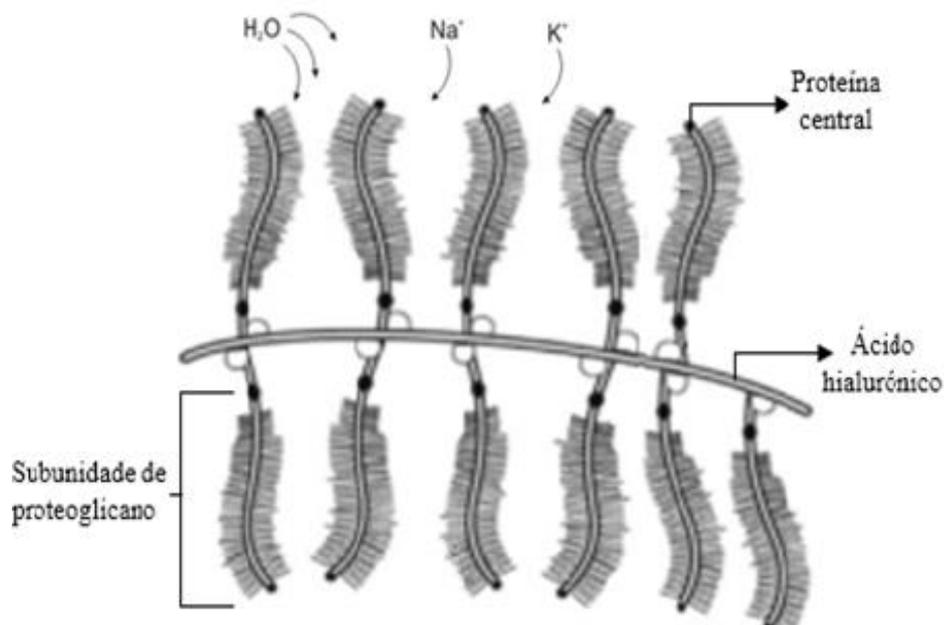


Figura 2.1. Representação esquemática dos proteoglicanos (adaptado de [27]).

As subunidades de proteoglicanos formadas da ligação de glicosaminoglicanos às proteínas centrais, agregam-se ao ácido hialurônico formando um agregado de proteoglicanos (Figura 2.1) [39]. Estes agregados de proteoglicanos são macromoléculas que promovem a

imobilização das subunidades de proteoglicanos dentro de uma malha fina de colagénio, contribuindo para a estabilidade funcional, rigidez e durabilidade da matriz extracelular [21],26]. Como os agregados de proteoglicanos por si só não oferecem resistência significativa às tensões de tração, a interação destes com a rede de colagénios possibilita a formação de uma matriz sólida capaz de suportar tanto as tensões de compressão como as tensões de tração e de corte, e/ou mesmo a combinação dessas forças [43,44].

Enquanto compósito orgânico, a estrutura da cartilagem articular é essencialmente caracterizada pelo equilíbrio entre a pressão osmótica criada pelos proteoglicanos e as propriedades estruturais e mecânicas das fibras de colagénio [29].

Colagénio

O colagénio é a macromolécula mais abundante na matriz extracelular, representando cerca de 60% do peso seco da cartilagem [34]. Dos diversos tipos de colagénios existentes, o colagénio tipo II é mais comum no tecido articular [39]. Este forma uma rede fibrilar em toda matriz com diâmetro dependente da profundidade no tecido, sendo cerca de 20nm na zona superficial e 70-120nm na zona profunda [42]. A rede fibrilar formada “aprisiona” o gel de proteoglicanos conferindo alta resiliência mecânica ao tecido articular, que é fundamental para a manutenção da conformação do tecido (Figura 2.2) [43].

Na cartilagem articular, os colagénios tipo IV, VI, IX e XI também estão presentes na matriz, mas em menor proporção, contribuindo na formação e estabilização da rede fibrilar do colagénio II [31],42].

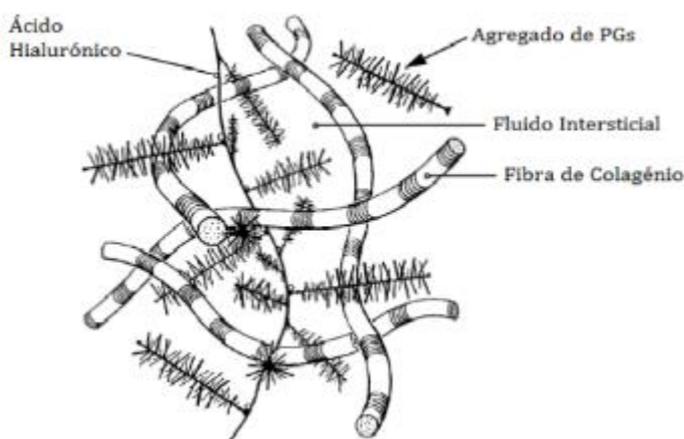


Figura 2.2. Representação das fibras de colagénio e agregados de proteoglicanos [20]

O colagénio II é constituído por três cadeias polipeptídicas $\alpha 1(\text{II})$ organizadas em tripla hélice, formando moléculas de tropocolagénio[39],45]. Estas cadeias polipeptídicas consistem no arranjo periódico de sequências tripeptídicas, com glicina, prolina e hidroxiprolina representando os principais aminoácidos das cadeias [31]. A organização e sobreposição das cadeias

polipeptídicas em tripla hélice confere a cartilagem elevada resistência à tração, e contribui para a estabilização da matriz [21],33]. No entanto, a resistência à compressão é mínima devido à configuração da fibra, ou seja, dado o rácio entre o seu elevado comprimento (300 nm) e o seu reduzido diâmetro [23,43[44].

A organização das fibras de colagénio, bem como dos restantes componentes (proteoglicanos, água, condrócitos) do tecido cartilágneo variam com a profundidade da matriz [43,48].

2.2. Organização estrutural

A cartilagem articular nativa apresenta uma organização zonal, baseada em quatro zonas: a superficial, a zona intermédia, a zona profunda e a zona calcificada [33,49] (Figura 2.3). Esta organização zonal que confere propriedades mecânicas anisotrópicas à cartilagem articular é determinante para o funcionamento normal da articulação [49,50].

As zonas são uma função da morfologia e orientação dos condrócitos e colagénio tipo II, com cada zona a apresentar uma matriz extracelular de composição e organização única e condrócitos com propriedades metabólicas distintas (Figura 2.4) [4,35,51].

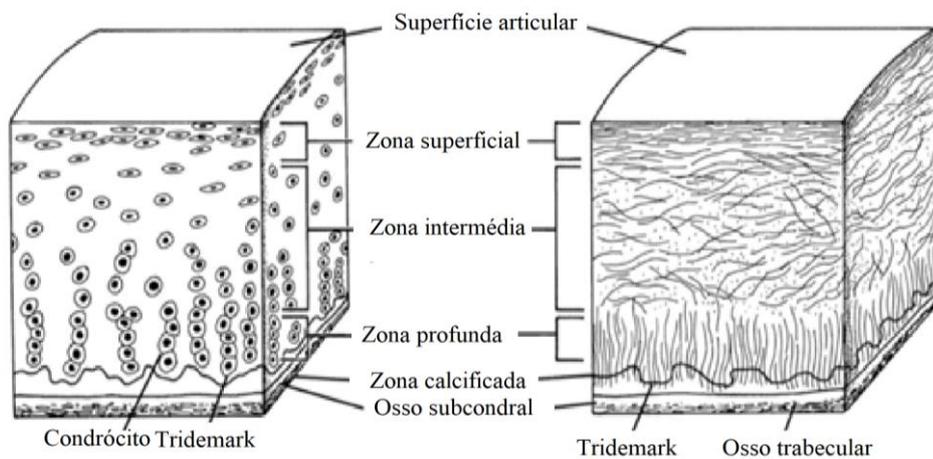


Figura 2.3. Organização estrutural dos condrócitos (esquerda) e das fibras de colagénio (direita) na CA (adaptado de [48]).

Como uma função da organização zonal, as fibras de colagénio variam na sua orientação, passando de horizontais na região superficial para uma disposição aleatória na zona intermediária e finalmente, orientando-se perpendicularmente à superfície do osso subcondral na zona profunda [27,52]. A distribuição não homogénea das fibras de colagénio permite que a cartilagem apresente diferentes características ao longo da sua espessura, distribuindo melhor as tensões internas nas

zonas de aplicação da carga [20]. Assim como as fibras de colagénio, os condrócitos assumem uma organização similar, isto é, na zona superficial tem-se células planas alinhadas paralelamente à superfície articular, mas na zona intermédia, as células arredondadas estão distribuídas aleatoriamente, e na zona profunda as células estão dispostas cilíndricamente entre as fibras de colagénio [50].

Zona superficial

A zona superficial representa aproximadamente 10-20% da espessura da cartilagem articular [48]. Esta camada é composta por condrócitos planos, uma elevada concentração de colagénio (principalmente colagénio tipo II e IX) e baixo teor de proteoglicanos [26,33,48]. As células planas, estão entre as fibras de colagénio e dispostas alinhadas paralelamente à superfície do tecido [48].

A disposição dos elementos da matriz, bem como a atividade dos mesmos nesta camada, permitem que esta atue como uma membrana impermeável à passagem de grandes moléculas, como anticorpos do líquido sinovial para a cartilagem e numa primeira instância como uma barreira às tensões impostas na estrutura [2,26,33,45].

Embora esta zona seja a mais rica em fibras de colagénio e células, a reduzida atividade metabólica dos condrócitos, dificulta a regeneração desta camada. Portanto, qualquer lesão ou processo degenerativo que danifique esta superfície protetora submeterá as camadas adjacentes às mesmas condições [27].

Zona intermédia

A zona intermédia funciona como uma ponte anatómica e funcional entre as zonas superficial e profunda [31]. Esta representa 40% a 60% do volume total de cartilagem e contém proteoglicanos e fibras de colagénio dispersas aleatoriamente na matriz [9,33]. A orientação preferencial das fibras de colagénio e a sua baixa densidade na matriz conduz à uma grande acumulação de água e proteoglicanos [21].

Nesta camada, os condrócitos são arredondados e assim como os restantes componentes, encontram-se aleatoriamente e homoganeamente distribuídos [2,26]. E apesar da densidade dos condrócitos ser menor que na zona superficial, a atividade metabólica destes sugere uma capacidade de reparação acrescida [27].

Zona Profunda

A zona profunda representa aproximadamente 30-40% do volume da cartilagem articular, e é composta por condrócitos esféricos agrupados em colunas paralelas às fibras espessas de colagénio [51,52].

Esta camada, assim como a intermédia desempenha um papel importante na sustentação de peso e absorção de choques por parte da cartilagem [50]. E isto devido ao aumento de proteoglicanos com a profundidade, que em combinação com as fibras de colagénio proporcionam às zonas profunda e intermédia propriedades mecânicas superiores à zona superficial [51]. Ao contrário da camada superficial que é projetada para resistir às forças de corte, as camadas inferiores dada à orientação das fibras de colagénio e a elevada concentração de proteoglicanos, são adequadas para resistir às forças de compressão e tração. Quando a matriz é sobrecarregada, as forças na cartilagem articular podem ser uma combinação das tensões de corte (camada superficial) mais tração e compressão (camadas intermédia e profunda) [27].

Zona calcificada

Quanto à zona calcificada, esta desempenha um papel fundamental na fixação da cartilagem ao osso, “ancorando” as fibrilas de colagénio da zona profunda ao osso subcondral, ou seja, as fibras de colagénio da zona profunda agrupam-se em feixes maiores que adentram a zona calcificada chegando ao tecido ósseo [26,43,48].

A linha ondulada e irregular que separa a zona profunda da zona calcificada é conhecida como “*Tidemark*” [24]. Esta consiste numa banda de fibrilas de colagénio I estruturalmente forte que permite a fixação das fibrilas de colagénio II que se estendem para a zona profunda [48].

As células desta região da matriz são hipertróficas e apesar da reduzida concentração são responsáveis pela mineralização da matriz, fornecendo uma excelente interface para a integração do tecido ósseo [24,33,45].

2.3. Comportamento mecânico

A cartilagem articular é constituída por uma rede tridimensional de fibras de colagénio, proteoglicanos e fluido intersticial, que desempenha um papel crucial na resposta às carga no tecido [52]. O comportamento mecânico do tecido é determinado portanto, pela interação predominante entre os elementos da matriz extracelular [53].

Em termos biomecânicos, a cartilagem apresenta um comportamento viscoelástico dependente do fluxo do fluído intersticial no tecido [26,36,57]. Ou seja, ao aplicar uma carga tem-se um aumento imediato da pressão do líquido intersticial, que acoplado a baixa permeabilidade da matriz impede a rápida deformação do tecido [31]. No entanto, apesar da baixa permeabilidade

hidráulica, o fluido intersticial pode ser movido para fora da matriz se a compressão for mantida [28]. Mas, nos casos em que a carga é removida, o fluido intersticial retorna à matriz, o que confere ao tecido um comportamento similar ao de uma “esponja” [33,56].

Na aplicação constante de uma carga, a deformação do tecido bem como o deslocamento do fluido intersticial dá-se até que seja alcançado um novo estado de equilíbrio [3],33,43]. E nesse estado, a cartilagem é simplesmente modelada como uma estrutura porosa e permeável, com um comportamento mecânico independente do fluxo do fluido intersticial [26]57]. Um outro aspecto a considerar é a força repulsiva entre as cargas negativas das subunidades de proteoglicano [55]. E isto porque, os proteoglicanos em ambiente aquoso, são polianiónicos, ou seja, a molécula apresenta carga negativa em certos locais da sua estrutura [20]. Na matriz, a mútua repulsão dessas cargas provoca a dispersão do agregado de proteoglicanos, que ocupa um volume limitado pela rede de colagénio [21]. Quando comprimidas, as subunidades de proteoglicano são pressionadas umas contra outras, o que aumenta a força de repulsão entre as cargas, e com isso a resistência mecânica da cartilagem à compressão [53],58].

A rede de colagénio ao delimitar os agregados de proteoglicano, fortalece a estrutura e permite aumentar a resistência dos mesmos às cargas no tecido, pelo que danos a nível da malha de colagénio tem implicações na resistência do tecido à compressão [53].

A interdependência entre a permeabilidade e a deformação da matriz extracelular permite modelar a cartilagem articular como um compósito orgânico, formada por fases líquida e sólida [53].

2.4. Lesões da cartilagem

Enquanto material heterogéneo anisotrópico, a cartilagem articular apresenta propriedades mecânicas adequadas ao suporte de cargas cíclicas ou estáticas, demonstrando pouca ou nenhuma evidência de dano ou desgaste [31]. No entanto, quando lesionado o funcionamento normal do tecido cartilágneo fica condicionado, dificultando o movimento articular.

As lesões cartilágneas associadas à traumas de origem aguda (impacto), cumulativa (desgaste articular), ou fatores de suscetibilidade individual (causas patológicas) continuam a representar um desafio clínico dada à fraca capacidade regenerativa deste tecido [59-61].

Quando duas superfícies articulares sustentam o impacto de uma carga intensa, pode ocorrer a lesão do tecido articular e se a carga for significativa o suficiente, pode ainda resultar na lesão do tecido ósseo [2].

De acordo com o tipo de trauma e resposta tecidual, as lesões da cartilagem podem ser classificadas como: microlesão, fratura condral e fratura osteocondral [58]. Na microlesão, as células e matriz são afetadas, mas sem haver rutura mecânica visível da superfície articular. Já na

lesão condral, tem-se a rutura mecânica da superfície articular (fibrilação, fissuras, desgaste da camada articular), mas sem o comprometimento do osso subcondral [59]. E na lesão osteocondral, contrariamente à lesão condral, o tecido ósseo é afetado, ou seja, a lesão estende-se do tecido cartilágneo até ao osso subcondral [58]. Para os casos em que a lesão afeta o osso subcondral, os vasos sanguíneos do tecido ósseo que passam a irrigar o tecido articular, potenciam a reparação da região lesionada [2,64]. Contudo essa reparação representa a formação de um tecido (fibrocartilagem) de propriedade mecânica inferior [7],63].

Os desafios inerentes à reparação/regeneração do tecido articular continuam sendo constantes, apesar dos avanços recentes. No próximo tópico é analisado o papel da engenharia de tecidos na mitigação das lesões da cartilagem.

2.5. Engenharia de tecidos para cartilagem

A engenharia de tecidos representa uma solução estimulante para os tratamentos atualmente disponíveis para as lesões da cartilagem articular [38]. No entanto, apesar dos inúmeros estudos realizados nesta área na última década, recriar um tecido que imite inteiramente as propriedades e a estrutura da cartilagem nativa, tem-se revelado clinicamente desafiante [61]. E isto porque, embora as soluções exploradas promovam a regeneração da cartilagem, o tecido formado *in vivo* ou *in vitro* não possui as mesmas propriedades biomecânicas que o tecido nativo [1,52,66]. Contudo, os constantes esforços e avanços nas mais diversas áreas científicas (biomateriais, ciências biológicas, biomecânica, etc.) têm permitido aproximar a perspectiva da realidade, relativamente à regeneração do tecido articular.

Entre as estratégias de engenharia de tecidos para a regeneração da cartilagem, a combinação de condrócitos ou células percursoras de condrócitos, fatores de crescimento e estruturas biomiméticas feitas de biomateriais naturais e/ou sintéticos, tem-se revelado numa alternativa promissora [12,54,66-68]. A incorporação de células em suportes tridimensionais torna o processo de regeneração da cartilagem mais complexo, mas permite coordenar significativamente o processo e superar algumas das limitações encontradas no uso de células ou biomateriais isoladamente [9]. Nesta abordagem, as estruturas biomiméticas desempenham um papel crucial, uma vez que, ao imitarem temporariamente as funções básicas da matriz extracelular, conferem: (a) adesão celular, (b) estabilidade mecânica e (c) orientação estrutural, permitindo uma formação temporal e espacialmente coordenada do novo tecido [64].

Em aplicações ortopédicas, a cartilagem projetada precisa de integrar-se com o tecido nativo adjacente, bem como, em muitos casos, com o osso subcondral. Para isso, as propriedades mecânicas da cartilagem manipulada, bem como organização zonal devem sempre coincidir com as do tecido adjacente, a fim de recriar a relação estrutura-função da cartilagem nativa [54,65].

Esses aspetos tornam o processo de reparação da cartilagem e a transição do mesmo para o meio clínico num mecanismo complexo e desafiante.

Em suma, com a engenharia de tecidos da cartilagem pretende-se recriar uma arquitetura capaz de suportar o crescimento e a expansão das células cartilagíneas, facilitar sua difusão e movimento livres por toda a estrutura e que apresente um comportamento mecânico análogo ao do tecido nativo [10].

Nos pontos seguintes, serão analisados: os biomateriais para a regeneração da cartilagem e as propriedades inerentes; técnica de produção dos *scaffolds* - *Electrospinning* (em 2.5.2) e as técnicas associadas ao método de sementeação celular estática (em 2.5.3). Essas técnicas de sementeação constituem o foco deste trabalho.

2.5.1. Biomaterial

Em engenharia de tecidos da cartilagem, a seleção do biomaterial é determinante para o sucesso da aplicação. Na fabricação dos *scaffolds*, propriedades como: biocompatibilidade, taxa de degradação compatível a taxa de regeneração do tecido e propriedades mecânicas análogas às do tecido a regenerar, têm constituído alguns dos pré-requisitos na escolha do biomaterial [65][71].

Os biomateriais poliméricos têm sido amplamente explorados enquanto *scaffolds* para a regeneração de cartilagem [51][72,73]. Estes, que podem ser naturais ou sintéticos, apresentam propriedades específicas necessárias às aplicações da engenharia de tecidos para a cartilagem *in vitro* e *in vivo* [65]. Os polímeros naturais (gelatina, fibrina, colagénio, ácido hialurónico, quitosano, por exemplo), por conseguirem interagir com os recetores celulares, potenciam a adesão e o crescimento celular [51],74]. Como aspetos negativos, estes possuem uma baixa estabilidade mecânica, térmica e química, e uma elevada taxa de degradação [66],75,76]. Por outro lado, os polímeros sintéticos (ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), por exemplo) incapazes de interagirem com as células, refletem uma pobre afinidade celular, mas apresentam propriedades mecânicas e taxa de degradação adaptáveis às necessidades da aplicação e são mais fáceis de processar [73,75,77,80]. Isoladamente, tanto os polímeros sintéticos como os naturais não satisfazem os requisitos da engenharia de tecidos para a cartilagem, no entanto, a combinação das duas classes poliméricas representa uma estratégia viável no desenvolvimento de um biomaterial multifuncional e capaz de melhor imitar o tecido nativo [68].

A policaprolactona (PCL), polímero sintético biodegradável e biocompatível aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) é amplamente utilizado em muitos estudos e

aplicações biomédicas (dispositivos de administração de medicamentos, suturas e barreiras implantáveis) [76,78-80]. Com um perfil de degradação incrivelmente lento – entre 2 a 3 anos, solúvel numa variedade de solventes orgânicos e miscível com diversos polímeros, o PCL constitui um biomaterial de fácil processamento capaz de suportar a regeneração do tecido cartilágneo [71,77,81,82]. No entanto, assim como a maioria dos materiais poliméricos biodegradáveis, a superfície do PCL possui propriedades hidrofóbicas intrínsecas que o torna desfavorável ao crescimento celular [77]. Esta característica hidrofóbica que não só dificulta a adesão das células no *scaffold*, como também retarda a difusão das mesmas, favorece a desigual distribuição de células por toda matriz porosa [39]. Por outro lado, a Gelatina é um polímero natural e dada às suas propriedades biológicas (reconhecimento celular), biodegradabilidade, biocompatibilidade e viabilidade comercial a baixo custo, é usada em diversas aplicações da ET (adesivos farmacêuticos, selantes para próteses, etc.) [79,84]. No entanto, a rápida taxa de degradação e uma superfície altamente hidrofílica dificulta a sua utilização como material de suporte [73]. E isto porque, considera-se que uma elevada taxa de degradação condiciona o desempenho mecânico do biomaterial, e uma superfície altamente hidrofílica conduz à rápida dissolução do biomaterial durante a cultura celular ou implantação [69,78]. Mas por apresentar sequências de reconhecimento celular (arginina-glicina-ácido aspártico (RGD)), a Gelatina promove adesão, diferenciação e proliferação celular [80].

Neste trabalho um outro polímero foi tido em consideração na fabricação dos *scaffolds* – o Polietilenoglicol (PEG). O PEG ou também conhecido como óxido de polietileno (PEO) é um polímero sintético, biocompatível e de baixo custo, apresenta um baixo ponto de fusão, uma rápida taxa de solidificação e é solúvel em água [86-[82]89]. A elevada solubilidade em água, torna o PEG num biomaterial adequado para o aumento da porosidade dos *scaffolds*, no sentido em que a sua incorporação seguida da remoção (com água) deixa poros que podem ser usados para a difusão de células e nutrientes. Ainda que a presença de PEG seja temporária, pretende-se com a conjugação desses materiais (PCL, Gelatina e PEG), tirar partido dos aspetos positivos de cada um e atribuir ao biomaterial resultante (*scaffold*) propriedades mecânicas e biológicas adequadas ao crescimento do tecido cartilágneo.

2.5.2. Técnica de produção - *electrospinning*

Electrospinning é uma técnica amplamente usada em engenharia de tecidos para a produção de *scaffolds* poliméricos [84]. Emergiu como uma técnica poderosa na produção de fibras de alta resistência, por permitir controlar a disposição e o diâmetro das mesmas [85]. Nesta técnica são usadas soluções poliméricas, onde através da aplicação de uma tensão elétrica, ocorre ejeção e deposição do polímero em forma de fibras numa superfície coletora (Figura 2.4). Na

prática, esta técnica baseia-se num sistema composto por três componentes: uma fonte de alimentação de alta tensão, uma seringa contendo a solução polimérica e uma placa coletora [84].

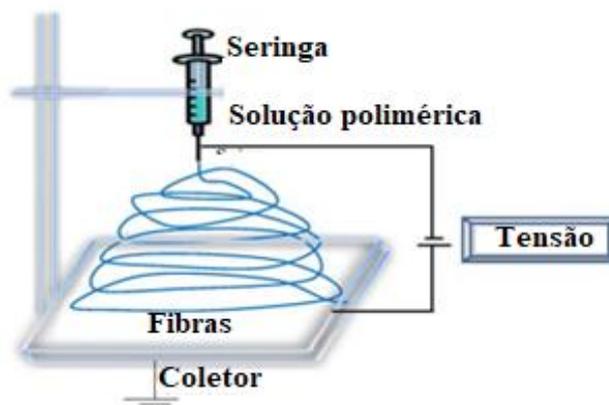


Figura 2.4. Representação esquemática do Electrospinning (adaptado de [84])

A capacidade de produzir fibras nanométricas capazes de imitar as fibras de colagénio da MEC, tem tornado o *electrospinning* numa técnica relevante para as aplicações da engenharia de tecidos para a cartilagem [54,76]. Na produção de estruturas fibrosas, fatores como: diâmetro das fibras, disposição das fibras, porosidade e dimensão dos poros, modificação química da superfície por revestimento ou adsorção de proteínas naturais que introduzem sítios de reconhecimento celular, desempenham um papel importante na interação biomaterial - célula e consequentemente na formação do tecido articular [86].

O diâmetro das fibras, em particular, que pode ser variável desempenha um papel crucial na determinação das propriedades mecânicas dos *scaffolds*, uma vez que, ao variar o diâmetro das fibras, varia-se também o tamanho dos poros e consequentemente a resistência mecânica do material final [1,93,94]. Para um melhor resultado é essencial que durante a produção do *scaffold* as condições que determinam o diâmetro das fibras sejam controladas de forma a assegurarem uma porosidade adequada.

A porosidade e a interconetividade entre os poros são fatores de grande importância na difusão de células, transporte de nutrientes e remoção de resíduos da matriz porosa [89]. Uma alta porosidade e a interconetividade dos poros promove a adesão e o crescimento celular. No entanto, os materiais fabricados por *electrospinning* apresentam os poros intrinsecamente pequenos dificultando a incorporação de células e consequentemente o crescimento do tecido [90]. A capacidade de aumentar o tamanho dos poros dos *scaffolds* mantendo a morfologia das fibras e a interconetividade entre os poros tem-se revelado extremamente importante em engenharia de tecidos [90].

Outro fator a considerar durante a fabricação de *scaffolds* é a orientação das fibras principalmente quando se pretende criar um tecido anisotrópico como o tecido cartilágneo. No *electrospinning*, a disposições das fibras depende da geometria e da velocidade de rotação do

coletor, permitindo obter fibras dispostas de forma ordenada e aleatória [1]. Esta disposição permite imitar a organização estrutural do tecido cartilágneo natural.

Em suma, é fundamental que a técnica de fabricação e o biomaterial usado assegurem não só a organização estrutural do *scaffold* como também as propriedades mecânicas e morfológicas (porosidade, rugosidade) determinantes para o crescimento do tecido cartilágneo. O ideal é um *scaffold* que imite na perfeição a matriz extracelular do tecido nativo.

***Scaffolds* de PCL/Gelatina**

A ideia de produzir estruturas 3D que imitem a mesma organização zonal do tecido cartilágneo tem constituído a base de muitos trabalhos científicos, onde estruturas fibrosas à base de PCL têm sido amplamente utilizadas [91]. McCullen *et al.* [1] por exemplo, recriaram a anisotropia da matriz cartilágnea, variando tanto o tamanho (1 μ m e 5 μ m) como a orientação da fibras de PCL, imitando assim a orientação e organização zonal das fibras de colagénio da cartilagem nativa (Figura 2.5).

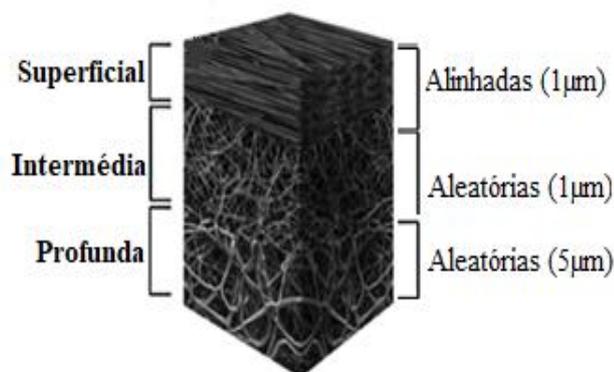


Figura 2.5. Ilustração da organização zonal da cartilagem articular em *scaffold* de PCL (adaptado de [1]).

Com base nos resultados, verificaram que essas estruturas anisotrópicas potenciavam tanto a proliferação de condrócitos, como a produção de colagénio tipo II e de uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos. E que os condrócitos assumiam a mesma configuração que as fibras poliméricas, ou seja, dispunham-se horizontalmente na superfície e aleatoriamente nas camadas adjacentes. Relativamente às propriedades mecânicas, essas estruturas apresentaram um módulo de compressão próximo do do tecido nativo e um módulo de tração mais elevado do que o módulo das estruturas homogéneas aleatórias, sugerindo que a adição de fibras alinhadas contribuía para o aumento do módulo de tração.

Assim como no trabalho anterior, Steele *et al.* [47] também recriaram a organização zonal da matriz cartilágnea, através da deposição de fibras de PCL alinhadas sobre estruturas 3D porosas de PCL (Figura 2.6). Neste trabalho, segundo os autores a camada superficial por

assemelhar-se à zona superficial do tecido nativo, permitia aumentar as propriedades de tração, reduzir a rugosidade superficial e a estrutura porosa assegurava a completa infiltração das células. Os resultados obtidos permitiram concluir que as estruturas anisotrópicas asseguravam as principais características mecânicas e funcionais da cartilagem nativa, assim como a formação de cartilagem *in vitro*.



Figura 2.6. Representação esquemática de scaffold anisotrópico de PCL. (adaptado de [47]).

Um outro estudo é o de Accardi *et al.* [92], que avaliaram o comportamento mecânico de *scaffolds* contendo fibras aleatórias e alinhadas. E da análise dos resultados, concluiu que a orientação da fibra influenciava diretamente as propriedades mecânicas dos *scaffolds*.

Outra referência na literatura é o trabalho Wise *et al.*[93], que produziram fibras macro e nanométricas de PCL alinhadas e os resultados demonstraram que as células estaminais mesenquimais humanas (hMSC) foram capazes de manter o alinhamento celular em ambas as estruturas fibrosas. Contudo, as fibras nanométricas apresentaram uma maior percentagem de colagénio tipo II, indicando que as estruturas nanofibrosas poderiam ser as mais adequadas para a engenharia de tecidos da zona superficial da cartilagem articular, uma vez que esta zona apresenta uma elevada percentagem de colagénio tipo II relativamente às outras camadas da cartilagem.

Já num trabalho mais recente, tem-se a recriação da anisotropia da cartilagem articular por A. F. Girão *et al.*[94], através do desenvolvimento de *scaffolds* de PCL com recurso aos hidrogéis de GO-colagénio para unir as camadas dos *scaffolds*. Segundo os autores, os *scaffolds* produzidos apresentam propriedades mecânicas muito próximas do tecido cartilágneo nativo, representando assim um enorme potencial para as aplicações da engenharia de tecidos da cartilagem.

O carácter biológico dos *scaffolds* de PCL na incorporação da gelatina também foi alvo de diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. J. Xue *et al.* [91] por exemplo, avaliaram no seu trabalho a adesão e proliferação da células da cartilagem em malhas de PCL/ Gelatina, e os resultados

permitiram constatar que estas asseguravam a adesão e proliferação das células, refletindo a boa biocompatibilidade dessas estruturas (Figura 2.7).

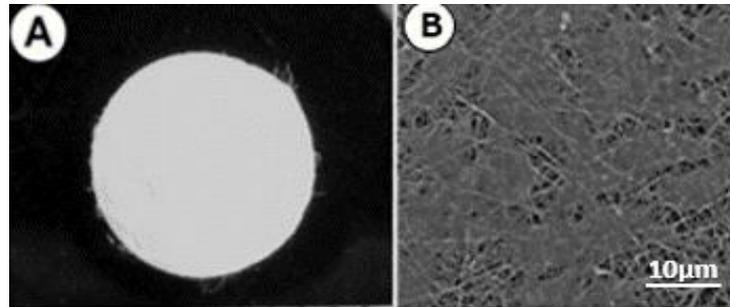


Figura 2.7.A) Membrana de PCL/Gelatina (7mm de diâmetro); B) Condrócitos na malha de PCL/Gelatina após 3 dias de sementeação *in vitro* (adaptado de [91]).

Na sequência do trabalho anterior, R. Zheng *et al.* [95] também estudaram a adesão e proliferação de células cartilagueas, mas em membranas com diferentes concentrações de PCL e de Gelatina e em todas verificou a adesão e formação do tecido cartilagueo após 3 semanas de cultura (Figura 2.8), reforçando mais uma vez a ideia de que *scaffolds* à base de PCL/Gelatina favorecem a adesão e a proliferação de células da cartilagem.

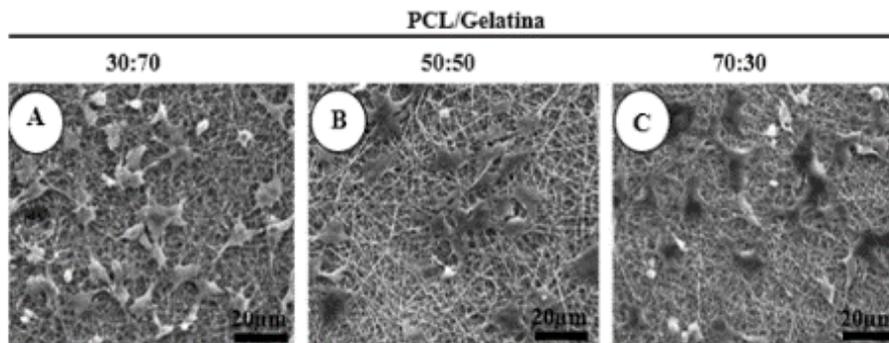


Figura 2.8. A) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (30:70); B) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (50:50) e C) Condrócitos em membranas PCL/Gelatina (70:30) (adaptado de [95]).

Zhang *et al.* [79] por sua vez, no seu trabalho compararam a afinidade e proliferação celular em *scaffolds* de PCL/ Gelatina e de PCL. E da análise dos resultados, verificou que os *scaffolds* que continham Gelatina permitiam uma maior adesão e crescimento celular (Figura 2.9.a) comparativamente aos de base PCL (Figura 2.9.b).

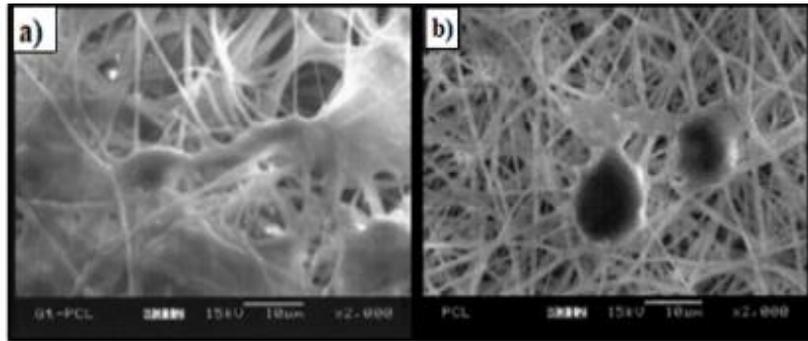


Figura 2.9. a) Células em scaffold à base de PCL/Gelatina ; b) Células em scaffold à base de PCL (adaptado de [79]).

Nestes e noutros estudos envolvendo a utilização de células da cartilagem ou outro tipo de células (referências: [73], [78] e [96]), os *scaffolds* de PCL/Gelatina demonstraram boa interação biomaterial-célula e propriedades mecânicas favoráveis ao crescimento do tecido nativo. Estes estudos reforçam, portanto, a combinação e a aplicação de *scaffolds* de PCL/Gelatina em engenharia de tecidos para a cartilagem.

2.5.3. Semeação de células

O sucesso da engenharia de tecidos da cartilagem depende da incorporação de células nos *scaffolds*, ou seja, do processo de semeação celular [13,103]. Com base nos processos de incorporação celular, os métodos de semeação celular são subdivididos em dois grupos: dinâmico ou direto e estático ou indireto [98].

No método dinâmico, para difusão das células é aplicada uma força externa, como: centrifugação, rotação, campo elétrico, campo magnético ou vácuo [10,105,106]. Como a maioria das técnicas de semeação celular dinâmica, estas potenciam uma distribuição celular uniforme por toda a estrutura porosa [8]. Contudo, podem exigir um longo período de execução e serem complexas e difíceis de implementar em contextos clínicos, o que pode constituir uma desvantagem [100].

O método estático baseia-se na deposição ou na injeção de um certo volume de células na superfície ou no centro do *scaffold* [8]. Em engenharia de tecidos, este é o método de semeação celular mais aplicado, dada à simplicidade do processo e dos materiais usados (como por exemplo uma pipeta) [16,104]. Relativamente às desvantagens, estas advêm do facto deste método apresentar uma densidade celular inicial relativamente baixa e uma distribuição celular não homogênea [15,105]. Como vantagens, é um método simples e isento de danos celulares, uma vez que a difusão das células ocorre gradualmente sem a aplicação de uma força externa [15,93].

Os detalhes de técnicas associadas ao método de sementeção estática são apresentados a seguir.

2.5.3.1. Sementeção estática por Pipetagem/Injeção

Esta técnica consiste em pipetar ou injetar diretamente células na superfície ou no interior do *scaffold* (Figura 2.10). Após a deposição da suspensão celular, o sistema é incubado por vários minutos e depois colocado num meio de cultura e incubado novamente de forma a permitir a adesão celular [15]. As células sementeadas por este processo podem ser incubadas durante várias horas e até mesmo por vários dias com o objetivo de maximizar a eficiência do processo.

Apesar da simplicidade na execução da técnica, esta apresenta uma eficiência de aproximadamente 10% - 25% [15].

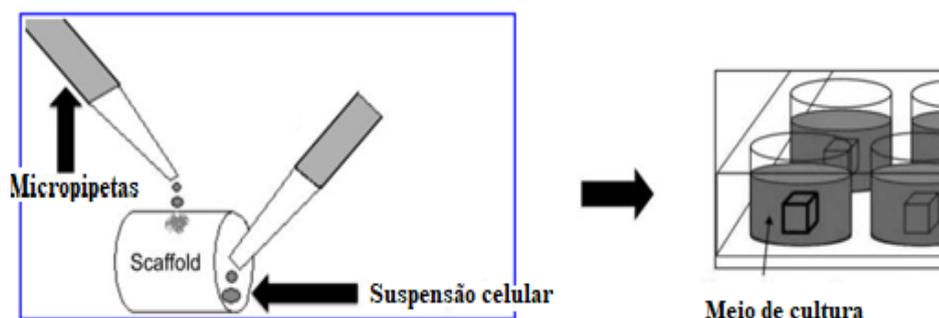


Figura 2. 10. Representação esquemática da sementeção celular estática (adaptado de [15] e [16]).

2.5.3.2. Sementeção estática por Compressão

Esta técnica baseia-se no método de sementeção dinâmica por pressão. Nesta técnica é aplicada uma pressão externa, que força a difusão das células para o interior do *scaffold* (Figura 2.11) [15]. A aplicação da pressão permite que ar preso na estrutura porosa (*scaffold*) se expanda de tal forma que ocorre a saída do mesmo do interior da estrutura. Com a saída do ar, uma porção substancial da suspensão de célula circundante é “empurrada” para o interior da matriz com a libertação da pressão [100]. A difusão da suspensão celular para o *scaffold* pode ser conseguida após 3-4 ciclos de libertação da pressão [100].

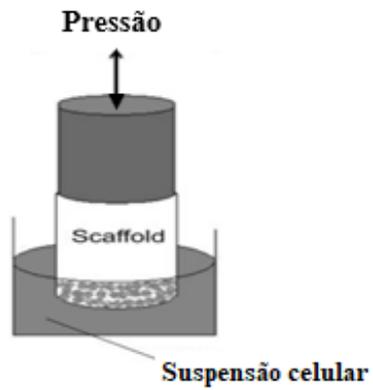


Figura 2.11. Representação esquemática da semente celular por compressão (adaptado de [15]).

Este capítulo foi dedicado aos temas cartilagem articular e engenharia de tecidos aplicada à cartilagem articular, pela importância que têm para esta dissertação. Contudo, vários outros aspectos relacionados poderão ter ficado por referir, pois o foco foi direcionado para os aspectos considerados os mais relevantes

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são descritas as metodologias adotadas na realização deste trabalho. Numa primeira etapa, apresentam-se os processos envolvidos na fabricação e na caracterização das malhas e dos *scaffolds* anisotrópicos à base de PCL/Gelatina. Posteriormente, descreve-se as técnicas de sementeação celular aplicadas e os métodos usados na validação das mesmas. A otimização do processo de sementeação das células foi tida em consideração durante toda a execução do trabalho, isto é, tanto na fabricação dos *scaffolds* como na própria incorporação das células nos *scaffolds*.

3.1. Fabricação de malhas de PCL/GEL

Com o objetivo de recriar a organização zonal da cartilagem articular nativa, neste trabalho a fabricação das camadas baseou-se no *electrospinning* de fibras de PCL/Gelatina (sistema de *electrospinning* NANON-01A). O *electrospinning* da malha PCL/Gelatina pelo método convencional, ou seja, usando um coletor cilíndrico metálico rotativo permitiu produzir as camadas superficial e profunda do tecido articular dada à orientação ordenada das fibras e a camada intermédia por apresentar as fibras dispostas aleatoriamente foi produzida através do *wet-electrospinning*, que usa um meio líquido como coletor.

Para o fabrico das zonas superficial e profunda, preparou-se uma solução 50:50 (v/v) de PCL/Gelatina em 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE) da Sigma Aldrich. Inicialmente, as soluções de 10% de PCL de peso molecular 80000 Da (Sigma Aldrich) e 10% de Gelatina (de pele porcina; Sigma Aldrich) em TFE foram preparadas isoladamente. Com as soluções totalmente homogêneas após 12-18 horas, procedeu-se a mistura das mesmas e à adição de uma pequena quantidade de ácido acético que permitiu aumentar a miscibilidade das duas soluções. Seguidamente, tendo-se a solução de PCL/Gelatina de concentração 10% (m/v), a fabricação da malha decorreu segundo os parâmetros apresentados na Tabela 3.1.

Assim como nas camadas superficial e profunda, a preparação da solução de PCL/Gelatina para a fabricação da camada intermédia seguiu os mesmos princípios, com exceção do coletor metálico rotativo que foi substituído por um coletor fixo líquido, isto é, pela solução aquosa de etanol (90%). A solução foi depositada sob forma de fibras durante 1 e 2 minutos.

Na fabricação da malha de PCL/Gelatina para as camadas superficial e profunda, foi realizado também o *electrospinning* em paralelo de PEG, com o intuito de aumentar a porosidade da malha. Para este processo, PEG de peso molecular 8000 Da (Sigma Aldrich) foi primeiramente

dissolvido em clorofórmio para obter uma concentração de 1.5 g/mL durante 30 minutos a 50°C. A incorporação deste polímero sintético na malha PCL/Gelatina seguiu os mesmos parâmetros de electrospinning que na solução de PCL/Gelatina, com exceção do caudal que foi de 4 mL/h e do tamanho da agulha. As condições de produção tanto da malha aleatória como da inserção de PEG podem ser observadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros do *electrospinning* para a produção das malhas de PCL/Gelatina.

		Co - <i>electrospinning</i>		Wet- <i>electrospinning</i>
		PCL/gelatina	PEG	
Voltagem (kV)		24 -30		21-30
Caudal da solução (mL/h)		1.5	4	1.5
Velocidade do coletor (rpm)		750		-
Distância entre agulha-coletor (mm)		90		135
Velocidade do <i>Spinneret</i> (mm/min)		5		
Deslocamento horizontal da agulha (mm)		5		-
Dimensão da agulha		21 G	18 G	21G
Condições ambientais	Temperatura (°C)	20-23		19 – 23
	Humidade (%)	30-44		35 -48

Na figura 3.1, tem-se a representação esquemática dos processos de *electrospinning* aplicados na fabricação da malha para as camadas superficial e profunda (Figura 3.1.a) e para a camada intermédia (Figura 3.1.b).

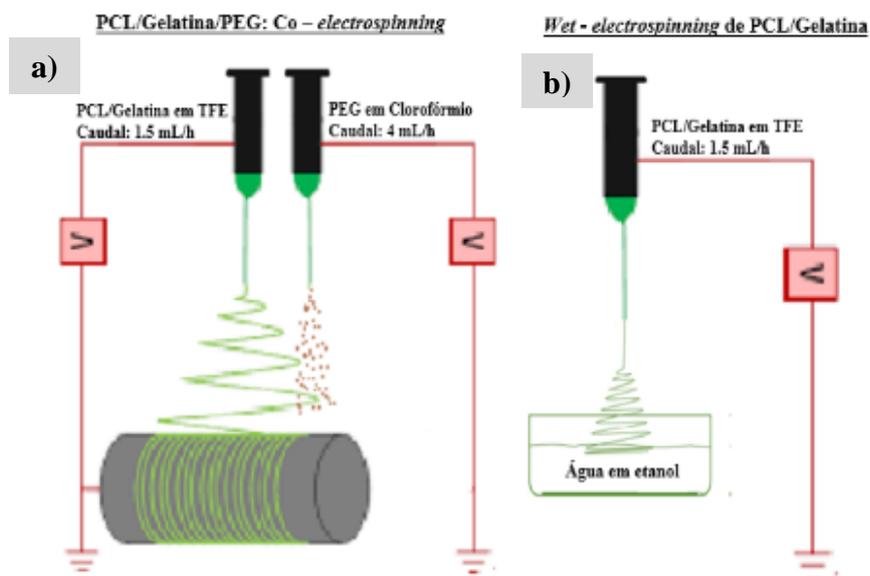


Figura 3.1. Ilustração dos processos de *electrospinning* aplicados na produção das camadas dos *scaffolds*: a) *Co-electrospinning* de PCL/Gelatina/PEG para as zonas superficial e profunda; b) *Wet-electrospinning* de PCL/ Gelatina para na zona intermédia.

Após o *electrospinning*, a fabricação dos *scaffolds* anisotrópicos baseou-se na replicação de quatro arquiteturas (H1, H2, H3 e H4) (Figura 3.2), que basicamente serviram de guia na montagem das malhas. Cada arquitetura possui uma organização estrutural única, isto é, a H1 é composta pelas três camadas (superficial, intermédia e profunda), a H2 pelas camadas superficial e intermédia, H3 pelas camadas superficial e profunda e a estrutura H4 constituída pelas camadas intermédia e profunda. O desenvolvimento dos *scaffolds* segundo essas arquiteturas, permitiu avaliar o comportamento mecânico e sobretudo a resposta celular nos diferentes microambientes.

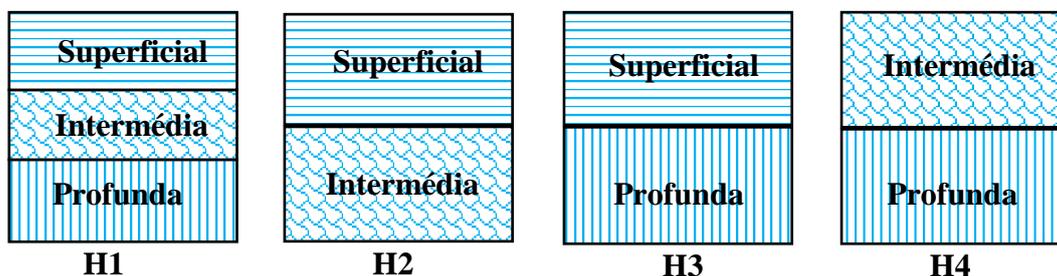


Figura 3.2. Representação esquemática das diferentes arquiteturas dos *scaffolds* desenvolvidos.

Na prática, essa replicação implicou numa primeira fase, o corte das malhas PCL/Gelatina/PEG. Para a camada profunda, as malhas foram cortadas em tiras de 4, 2.5 e 2 mm de largura e 40 mm de comprimento e relativamente à camada superficial, estas foram cortadas em círculos de 5 mm de diâmetro (Figura 3.3). Tendo-se os cortes de PCL/Gelatina/PEG,

procedeu-se numa segunda etapa, à otimização dos mesmos e das malhas de PCL/Gelatina produzidas pelo *wet-electrospinnig* (Figura 3.3).



Figura 3.3. Cortes das malhas para as camadas profunda (esquerda), superficial (centro) e as malhas produzidas por *electrospinning* (direita).

3.1.1. Otimização das malhas de PCL/Gelatina

Na produção das malhas de PCL/Gelatina/PEG, o PEG é depositado sob a forma de esferas, que quando removidas deixam orifícios que possibilitam a difusão de células por toda a estrutura. Assim sendo, procedeu-se à remoção de PEG, lavando os cortes de PCL/Gelatina/PEG, primeiro com uma série de soluções de etanol (90, 70, 50, 30 e 10 %,.) durante 20 minutos cada e, posteriormente 3-5 vezes com água destilada antes de efetuar a junção das camadas. Na prática, este processo de lavagem periódica das malhas com etanol cada vez menos concentrado, promove a gradual expansão das malhas que por sua vez, impede o colapso das fibras caso fossem colocadas diretamente em água. Este processo permite também esterilizar e remover possíveis impurezas que possam estar nas malhas.

Assim como as malhas PCL/Gelatina /PEG, as malhas obtidas por *wet-electrospinnig*, também passaram pelo processo de hidratação, passando de etanol 90% onde foram produzidas para as restantes concentrações de etanol, chegando finalmente à água destilada, onde foram também lavadas 3-5 vezes.

Numa tentativa de facilitar a futura compreensão dos resultados (capítulo 4), as malhas de PCL/Gelatina antes da remoção de PEG serão referenciadas como **PCL/Gelatina/ PEG** e após a remoção de PEG serão simplesmente referenciadas como **PCL/Gelatina s/ PEG**.

3.1.2. Montagem das malhas

Com as malhas de PCL/Gelatina otimizadas (PCL/Gelatina s/ PEG), procedeu-se à montagem das malhas de acordo com as arquiteturas desenvolvidas (Figura 3.2). Para a arquitetura H1, a assemblagem foi realizada enrolando a fibra de 2 mm de largura e 40 mm de

comprimento em espiral para a formação da zona profunda, e à esta foi adicionada a malha aleatória (de 1 minuto) e a camada superficial (5 cortes). E de forma a manter as camadas unidas, estas foram colocadas em moldes de teflon (5x5 mm) e congeladas por 24 horas à -20° C (Figura 3.4). O mesmo processo foi executado para as restantes arquiteturas, com exceção das estruturas H3 e H4, em que foram usadas fibras de 2,5 mm (H3) e 4 mm (H4) de largura para a produção da camada profunda. Um outro aspeto são as malhas aleatórias, que com exceção de H1, foram de 2 minutos em todas as estruturas (H2 e H4).

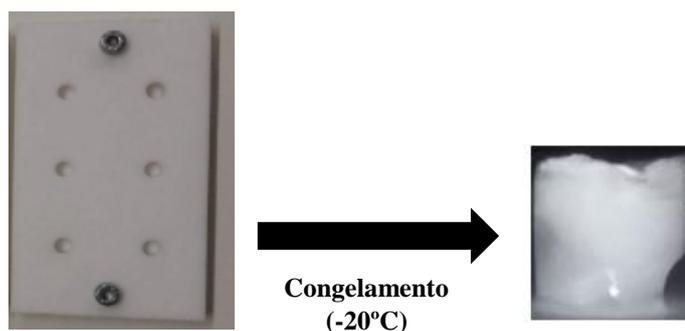


Figura 3.4. Montagem das camadas em moldes (5x5mm) e estruturas obtidas do congelamento.

Posteriormente, para fixação das camadas, estas foram imersas em hidrogéis de óxido de grafeno (GO)-colagénio. Os hidrogéis de GO-colagénio foram preparados de acordo com o procedimento descrito em A. F. Girão *et al.* [101]. A preparação de hidrogéis de GO-colagénio envolveu a mistura de colagénio de concentração 6 mg/mL (Sigma Aldrich®) mais a solução aquosa de GO de concentração 4 mg/mL (Graphenea®) numa razão de 24% (m/m). A solução resultante foi agitada durante 1 minuto e centrifugada durante 10 minutos à 10000 rpm (Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ X1 Centrifuge). Em seguida, o excesso de água foi removido e preencheram-se com hidrogel os moldes de teflon de 5 mm de profundidade e 10 mm de diâmetro (Figura 3.5. a). Posteriormente, as estruturas resultantes do congelamento das camadas foram retiradas dos moldes e introduzidas nos moldes contendo hidrogel, e posteriormente foram congeladas à -80°C e liofilizadas (Telstar IyoQuest HT-40, Beijer Electronics Products). Após a liofilização foram obtidos *scaffolds* anisotrópicos de PCL/Gelatina envoltos em hidrogéis porosos de GO-colagénio (Figura 3.5.b).

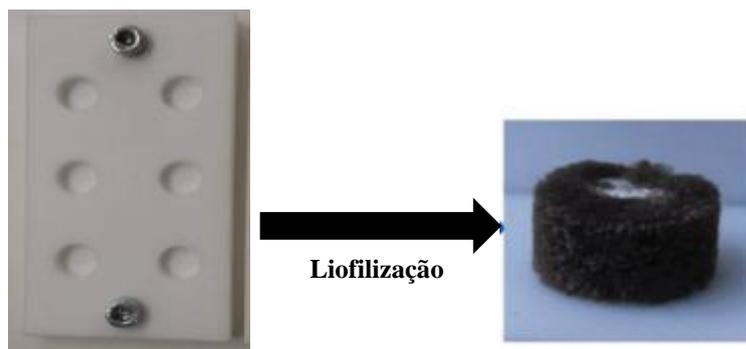


Figura 3.5. a) Moldes (10x5 mm); b) *Scaffolds* anisotrópicos resultantes da liofilização de PCL/Gelatina em hidrogéis de GO-colagénio.

3.2. Caracterização das malhas PCL/Gelatina

Nas malhas de PCL/gelatina/PEG resultantes do *electrospinning*, foram realizados estudos através dos quais se avaliou a topografia, a composição química e o comportamento mecânico dos *scaffolds*.

Para a caracterização topográfica, as malhas foram visualizadas no SEM (Microscópio Eletrónico de Varrimento: Hitachi SU 70; Hitachi High-Technologies Corporation, Krefeld, FR, Alemanha). Antes da observação no SEM, as malhas foram fixas em suportes metálicos específicos com o auxílio de fitas de carbono e sobre estas foi pulverizado ouro (Au) (Sputtering Coating with Vacuum Pump & Gold CY-1100X- SPC12-LD, China) para permitir a condução de elétrons necessária para obter as imagens no SEM. Com as imagens do SEM, mediu-se o tamanho médio das fibras e dos poros antes e depois da remoção do PEG (20 medições) através do ImageJ (programa de processamento de imagem).

Para efetuar a caracterização química das malhas, testou-se o caráter hidrofílico das malhas, medindo o ângulo formado entre as superfícies da água depositada e a malha (Equipamento: OCA 20 da Dataphysics) (Figura 3.6). E com base nos testes desempenhados, o caráter hidrofílico ($\theta < 90^\circ$) ou hidrofóbico ($\theta > 90^\circ$) da malha foi determinado por meio da média dos ângulos medidos.

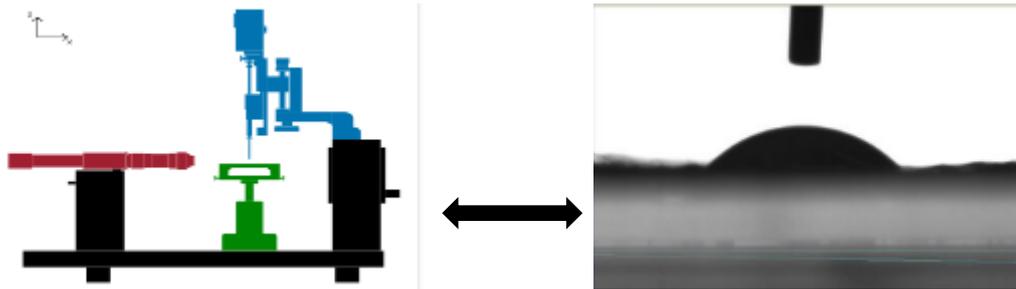


Figura 3.6. Representação do sistema de medição do ângulo de contacto - OCA 20 da Dataphysics (esquerda) (adaptado de [102]) e deposição de uma gota de água sobre a malha de PCL/Gelatina/PEG (direita).

Ainda no contexto químico, caracterizou-se também a composição da malha através da Espetroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR) de Perkin Elmer FT-IR System – Spectrum BX. Esse sistema de comprimento de onda entre $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$, resolução de 4 cm^{-1} e de 32 varrimentos, permite obter espectros correspondentes à vibração de certos grupos moleculares. Assim, com base nos espectros obtidos identificou-se os grupos moleculares característicos dos componentes da malha, nomeadamente PCL, Gelatina e PEG.

Quanto aos ensaios mecânicos, estes foram efetuados com o objetivo de testar a resistência das malhas à tração. Os ensaios foram executados com o auxílio do sistema Shimadzu MMT- 101N da Shimadzu Scientific Instruments. Inicialmente, as malhas foram cortadas em tiras de 2 e 0.5 centímetros de comprimento e largura respetivamente, e foram submetidas à um processo de alongação segundo uma taxa de 10 mm/minuto até um estado de cedência da malha, ou seja, até um estado próximo da rutura das fibras. O ensaio foi realizado com as malhas no estado seco e molhado de forma a avaliar o comportamento mecânico das mesmas nas duas condições.

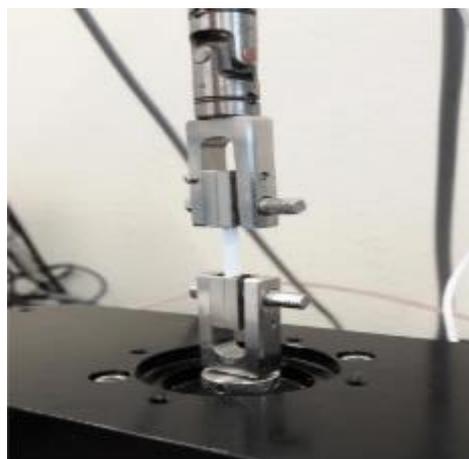


Figura 3.7. Ilustração da alongação de uma malha PCL/Gelatina/PEG pelo sistema Shimadzu MMT-101N.

3.3. Caraterização dos *scaffolds*

Relativamente aos *scaffolds*, a caraterização baseou-se em testes mecânicos, onde se avaliou a resistência das estruturas anisotrópicas à compressão. Ainda nesta etapa, avaliou-se também a turgescência dos *scaffolds*, através de pesagens periódicas das estruturas após a imersão em água.

A capacidade dos *scaffolds* de absorver líquidos foi determinada através da pesagem das estruturas antes da imersão em água (peso inicial seco) e depois da imersão em intervalos de tempo específicos (5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas). A percentagem de água absorvida foi calculada com base na equação seguinte (1):

$$\text{Taxa de turgescência} = \frac{W_w - W_d}{W_d} \quad (1)$$

onde o W_w representa o peso dos *scaffolds* quando húmidos e W_d o peso seco.

Em relação aos ensaios de compressão, os *scaffolds* foram testados aplicando uma carga a uma taxa de 1mm/minuto até se atingir uma deformação de 20% (Figura 3.8). A aplicação da carga decorreu após uma pré-carga inicial sobre os *scaffolds* de 0.07N. Todo o processo foi realizado no sistema Shimadzu MMT- 101N (Shimadzu Scientific Instruments) com os *scaffolds* molhados. Quanto aos módulos de compressão de cada arquitetura, esses foram calculados através da equação da reta tangente à porção linear da curva de tensão - deformação e considerou-se para tal, apenas as dimensões das estruturas (5x5mm de diâmetro e comprimento) sem o hidrogel.

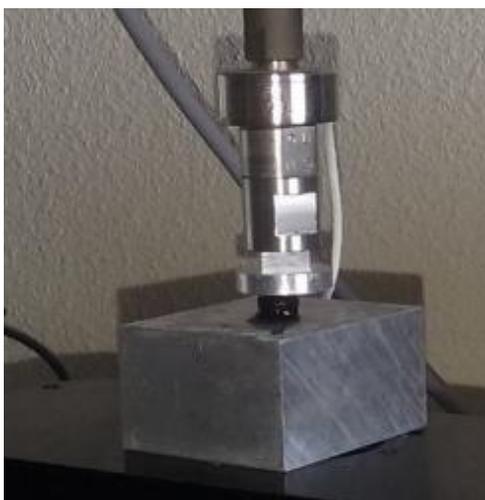


Figura 3. 8. Ilustração da compressão de *scaffolds* de PCL/Gelatina pelo sistema Shimadzu MMT- 101N.

3.4. Semeação celular (*Cell seeding*)

O processo de semeação das células decorreu em basicamente duas etapas: a) expansão das células de forma a se obter a densidade celular necessária para o processo e b) incorporação das células com base nas técnicas de semeação celular predeterminadas. Tendo-se as células incorporadas, foram analisados tanto o comportamento biológico através de testes de viabilidade metabólica (em 3.4.1) como a distribuição das células pelas camadas dos *scaffolds* com base em testes de coloração das malhas (em 3.4.2).

a) Expansão celular

A expansão das células progenitoras da cartilagem (CP5: Sigma Aldrich) decorreu em frascos T para cultura celular, com uma densidade inicial de 1 milhão de células. As células inicialmente criopreservadas (-80°C), foram descongeladas num banho à 37°C e colocadas num frasco T de 25 cm² com meio de cultura – Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F-12; Sigma Aldrich) suplementado com soro bovino fetal inativo (10% v/v; Sigma-Aldrich) e penicilina/estreptomicina (1% v/v; Sigma-Aldrich). As células foram mantidas sob uma atmosfera de 37°C e 5% de CO₂ humidificado e o meio de cultura foi mudado 2 vezes por semana. Ao atingir a confluência celular, as células foram transferidas para frascos maiores usando soluções de Tripsina/EDTA (0.25%; Sigma Aldrich) até se obter o número de células necessário para a semeação nos *scaffolds*.

b) Incorporação das células

Na semeação celular, as células expandidas foram incorporadas nos *scaffolds* com base em três técnicas de semeação celular estática: pipetagem (*top and bottom*); compressão e injeção com o auxílio de uma seringa.

Inicialmente os *scaffolds* esterilizados em etanol 70% por 4-5h foram em seguida, lavados 3 vezes com uma solução tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline (PBS); Sigma Aldrich) e imersos em meio de cultura DMEM/F-12 por 1-2 horas. De forma a aumentar a eficiência do processo, os *scaffolds* foram posteriormente secos em papel de filtro esterilizado durante 10 segundos. A determinação do tempo de secagem dos *scaffolds* foi com base em testes, no qual as estruturas secas em papel de filtro (por 10 e 20 segundos) e deixadas a secar ao ar (por 8, 12, 24 horas) foram pesadas antes e depois do processo de secagem. Da análise dos dados verificou-se na secagem ao ar que a partir das 8 horas tem-se uma diminuição acentuada do volume dos *scaffolds*, fazendo da secagem em papel de filtro, a técnica mais prática e adequada para a incorporação das células (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Representação das pesagens dos *scaffolds* secos ao ar e com papel de filtro.

Intervalo de tempo	Secagem ao ar			Secagem com papel de filtro	
	8h	12h	24h	10s	20s
Peso perdido (mg)	48.5	144	196	55.7	65.3

Após a secagem dos *scaffolds*, estes foram colocados em placas de cultura de 24 poços (oito *scaffolds* no total para cada arquitetura: dois *scaffolds* para controlo negativo (sem células) e seis para a sementeção de células e cada técnica de sementeção foi aplicada em dois *scaffolds*. Em cada *scaffold* foram sementeadas 0.5×10^6 células, seguido de um período de incubação de 1h30 a 37°C num ambiente humidificado com 5% de CO₂. A técnica de pipetagem (a partir de agora designada *top and bottom*) consistiu em pipetar parte da suspensão celular na base do *scaffold* (0.25×10^6 células) e o restante na superfície do *scaffold* após um período de incubação de 1h30m a 37°C num ambiente humidificado com 5% de CO₂. A técnica de compressão consistiu em aplicar uma certa pressão nos *scaffolds* à medida que se pipetava a suspensão celular no fundo do poço, de forma que após a remoção da carga houvesse infiltração das células nos *scaffolds*. Já a técnica de injeção foi conseguida injetando a suspensão celular no centro do *scaffold* utilizando uma seringa e agulha (27G). Também foram colocadas 0.5×10^6 células num poço como controlo positivo. Seguidamente, 1mL do meio de cultura DMEM/F-12 foi adicionado às placas de cultura contendo tanto os *scaffolds* da sementeção celular como os controlos e foram posteriormente colocados na incubadora à 37°C e 5% de CO₂ humidificado. O meio de cultura foi mudado 2 vezes por semana.

3.4.1. Viabilidade celular

A eficiência das técnicas sementeção celular foi avaliada através dos ensaios de resazurina, por quantificação da viabilidade celular no 1º, 3º, 7º, 14º e 21º dia após o processo de incorporação das células. A redução da resazurina (corante azulado) em resorufina (corante rosa) pelas células é usado como indicador em estudos de viabilidade celular [103]. Neste trabalho a solução de resazurina (0,1 mg/mL em PBS) misturada com o meio de cultura segundo uma razão de 1:9 v/v, foi adicionada aos *scaffolds*, seguido de um período de incubação de 5h à 37°C e 5% de CO₂ humidificado. Em seguida, 100 µl foram micropipetados para uma placa de cultura de 96 poços e a absorvância da solução foi medida a 570 nm e 600 nm. O cálculo da viabilidade foi dado pela equação (2):

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{\left(\frac{Abs\ 570\ nm}{Abs\ 600\ nm}\right)_{Amostras} - \left(\frac{Abs\ 570\ nm}{Abs\ 600\ nm}\right)_{Controlo-}}{\left(\frac{Abs\ 570\ nm}{Abs\ 600\ nm}\right)_{Controlo+}} \times 100 \quad (2)$$

Após a determinação da viabilidade das células nos *scaffolds* durante os 21 dias, os *scaffolds* foram lavados 2 vezes com PBS à 37°C e imersos em soluções de formaldeído em PBS (4% m/v) durante 1 hora, de forma a se fixar as células para uma posterior análise da distribuição das mesmas pelas camadas dos *scaffolds*.

3.4.2. Distribuição das células ao longo dos *scaffolds*

Após a fixação das células, procedeu-se ao corte dos *scaffolds* em secções de 10 e 30 µm de espessura. Para os cortes, os *scaffolds* foram embebidos em OCT (Optimal Cutting Temperature) e seccionados segundo planos sagitais num criostato (Leica CM3050 S). Para a visualização da distribuição das células ao longo do *scaffold* procedeu-se ao estudo imunocitoquímico dos núcleos das células.

3.4.2.1. Estudo imunocitoquímico dos núcleos

celulares

A coloração dos núcleos com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) forma um complexo DNA-DAPI que emite uma fluorescência branca azulada de comprimento 450 nm quando “excitado” pela luz ultravioleta [104]. Este efeito tem sido usado na identificação de núcleos e na avaliação da morfologia das células [105]. Assim, com este método pretende-se avaliar a distribuição das células nas camadas das estruturas anisotrópicas. Para tal, as secções dos *scaffolds* foram lavadas com PBS, permeabilizadas com uma solução de 0.5% de Triton X-1000 (Fisher Scientific) e bloqueadas com uma solução de 5% de FBS em PBS (Sigma-Aldrich). Posteriormente procedeu-se à incubação com DAPI (Sigma-Aldrich) para marcar os núcleos das células. Finalmente montaram-se as amostras com meio de montagem que previne o fotodecaimento da fluorescência. As amostras foram visualizadas recorrendo a um microscópio de fluorescência (Axioimager M2, 10x/0,25, Zeiss).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo pretende-se avaliar o alcance e a validade das ideias e propostas apresentadas no capítulo 3. A análise basear-se-á em resultados de testes de caracterização mecânica e biológica dos *scaffolds* em função das arquiteturas desenvolvidas e das técnicas de semente celular aplicadas. Ainda nesta secção, na análise de certos resultados serão feitas correlações com estudos/testes realizados sob as mesmas condições de forma a corroborar os dados obtidos.

4.1. Otimização da malha

Nesta secção, o aumento da porosidade das camadas foi o ponto chave e da análise das imagens obtidas no SEM verificou-se que os processos de otimização aplicados possibilitaram obter valores de porosidade promissores para a difusão das células. No caso das camadas superficial e profunda, a introdução seguida de remoção do PEG permitiu aumentar a porosidade da malha (ver Tabela 4.1). Nas imagens seguintes (Figuras 4.1. A e B), tem-se as malhas PCL/Gelatina antes e depois da remoção do PEG, e com base na medição da porosidade verificou-se que antes da remoção do PEG, a porosidade era de $9.6 \pm 2.5 \mu\text{m}$ e após a remoção do PEG atingiu-se uma porosidade média de $19.3 \pm 5.5 \mu\text{m}$. Este aumento da porosidade da malha acontece devido à dissolução dos PEG em água, que deixa orifícios da dimensão das partículas da PEG depositada na malha [3,86]. Os orifícios assim formados, permitirão a passagem e difusão das células na estrutura. Numa comparação com os valores de porosidade de estudos realizados no mesmo âmbito, verificou-se que os *scaffolds* de PCL/Gelatina apresentavam uma porosidade média entre $0.80 - 13.39 \mu\text{m}$ [102,112,113]. Estas diferenças nos valores de porosidade vêm portanto, salientar a importância do papel do PEG no aumento da porosidade da malha [114,115]. O uso de PEG para o aumento da porosidade dos *scaffolds* tem sido alvo de inúmeros estudos, como é o caso de B.M. Whited *et al.*[110] que no seu trabalho verificaram um aumento de porosidade dos *scaffolds* de PLLA:PEO ($9.86 \pm 5.39 \mu\text{m}$) em relação aos *scaffolds* não contendo PEO ($7.87 \pm 3.47 \mu\text{m}$), tendo sido esse aumento proporcional à percentagem de PEO nos *scaffolds*. Outro caso de estudo é o trabalho de Wang *et al.* [111] cujos *scaffolds* de PCL:PEO apresentaram uma porosidade de $34.47 \pm 8.07 \mu\text{m}$ comparativamente aos *scaffolds* não contendo PEO que apresentaram uma porosidade de $14.51 \pm 1.84 \mu\text{m}$. Tais estudos vêm confirmar o aumento de porosidade verificado nos *scaffolds* de PCL/Gelatina ($19.3 \pm 5.5\mu\text{m}$). Relativamente ao tamanho das fibras, não se verificou alterações antes ($0.6 \pm 0.2\mu\text{m}$) e depois ($0.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$) da remoção de PEG, indicando assim, que a incorporação bem como a remoção de PEG apenas altera a porosidade da malha [115,116]. A mesma situação é verificada no trabalho de Wang *et al.* [111],

com as malhas de PCL:PEO a apresentarem fibras de $1.82 \pm 0.91 \mu\text{m}$ e as malhas de PCL com fibras de $1.85 \pm 0.07 \mu\text{m}$. Assim como Wang *et al* [111], as fibras de Whited *et al.*[110] também não apresentaram diferenças significativas ($2.70 \pm 0.55 \mu\text{m}$ nas malhas de PLLA sem PEO e $2.71 \pm 0.41 \mu\text{m}$ nas malhas contendo PEO), facto que vai de acordo com os valores das fibras de PCL/Gelatina obtidos antes e após a remoção de PEG. Quanto à camada intermédia (Figura 4.2), o *wet-electrospinning* da solução de PCL/Gelatina permitiu obter malhas de $15.7 \pm 6.1 \mu\text{m}$ de porosidade média e $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ de tamanho médio das fibras (Tabela 4.1). Esta porosidade deve-se ao processo de hidratação das malhas, e isto porque, na produção de malhas de PCL/Gelatina sob as mesmas condições, mas sem o processo de hidratação obteve-se porosidade média de $7.734 \pm 2.504 \mu\text{m}$. No processo de hidratação das malhas, as moléculas de etanol ao ligarem-se às fibras de PCL/Gelatina, evitam o colapso das fibras e com isso a redução da porosidade da malha [76,118]. Além do processo de hidratação, o próprio método de produção das malhas também contribui para o aumento da porosidade da malha, no sentido em que a porosidade das malhas obtidas por *wet-electrospinning* se aproximam da porosidade das malhas obtidas por *co-electrospinning* após a remoção PEG [119,100].

De acordo com os resultados de porosidade obtidos e tendo em conta que as células da cartilagem apresentam uma dimensão entre $10\text{-}12 \mu\text{m}$, considera-se assim que as camadas (superficial, intermédia e profunda) apresentam porosidade adequada para incorporação e difusão das células[114].

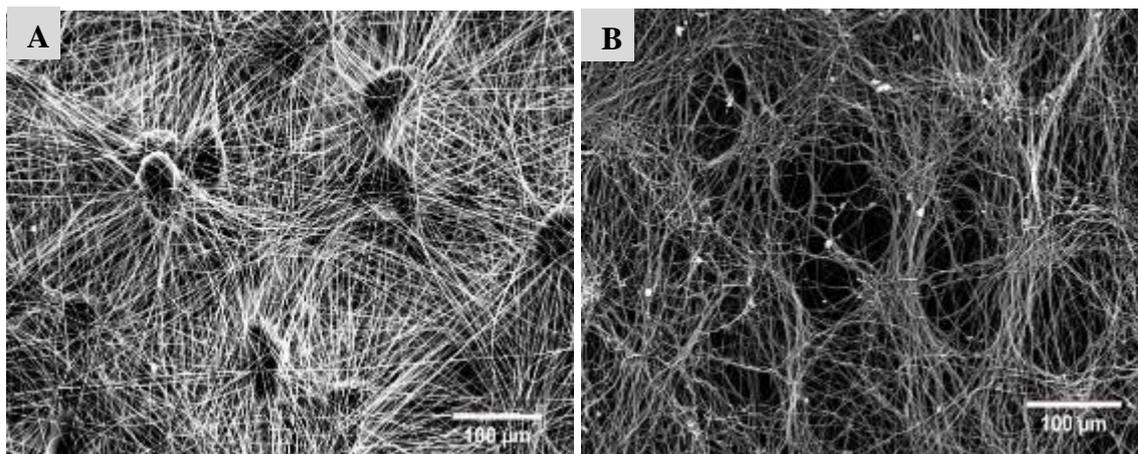


Figura 4.1. Imagens de SEM das malhas de PCL/Gelatina para as camadas superficial e profunda: A) Malha PCL/Gelatina com partículas de PEG; B) Malha de PCL/Gelatina após a remoção de PEG.

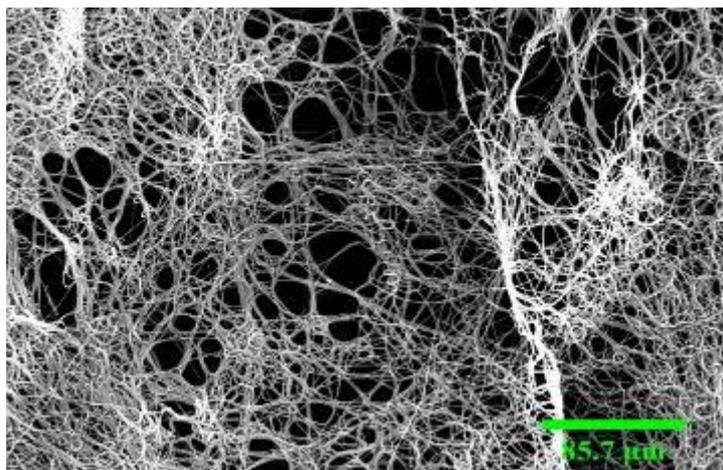


Figura 4.2. Imagem de SEM da malha de PCL/Gelatina obtida por wet-electrospinnig para a camada intermédia.

Tabela 4.1. Diâmetro médio dos poros e das fibras das camadas superficial, intermédia e profunda.

Camadas	Diâmetro médio dos poros		Diâmetro médio das Fibras	
	Antes da remoção de PEG / μm	Depois da remoção de PEG / μm	Antes da remoção de PEG / μm	Depois da remoção de PEG / μm
Superficial e Profunda	9.6 ± 2.5	19.3 ± 5.5	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1
Intermédia	15.7 ± 6.1		0.5 ± 0.1	

4.2. Caracterização da malha

A partir da caracterização das malhas obtiveram-se dados que descrevem o caráter hidrofílico/hidrofóbico (em 4.2.1), os grupos poliméricos presentes (em 4.2.2) e a resistência mecânica das malhas à tração (em 4.2.3). Esses dados permitiram ter a percepção se a malha criada apresentava as propriedades químicas e mecânicas adequadas ao crescimento do tecido cartilágneo.

4.2.3. Análise química

A identificação de bandas de comprimento de onda correspondentes a vibração de grupos moleculares permitiu identificar e confirmar a presença dos componentes das malhas (Figura 4.6). Nas malhas de PCL/Gelatina, o PCL é identificado pelas bandas 1170 cm^{-1} que representa a vibração simétrica de C-O-C, 1240 cm^{-1} que é a vibração assimétrica de C-O-C, 1722 cm^{-1} dada pela vibração de C=O, e 2943 cm^{-1} e 2866 cm^{-1} que representam as vibrações assimétricas e simétricas de CH_2 [76,78, 100, 121,122]. A gelatina por sua vez é identificada pelas bandas 1650 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} que representam as vibrações ao nível dos grupos amida I e II [69,78,102,123]. Ainda em relação à Gelatina é possível identificar a banda de 3286 cm^{-1} que representa a vibração

de N-H do grupo amida e a vibração de ligação O-H na malha de PCL/Gelatina. Relativamente ao PEG, este é identificado na malha de PCL/Gelatina/PEG pelos comprimentos de onda 1095 cm^{-1} que é tida como a vibração de C-O, 1146 cm^{-1} que representa a vibração simétrica da ligação C-O-C e 1467 cm^{-1} como a vibração da ligação C-H [118].

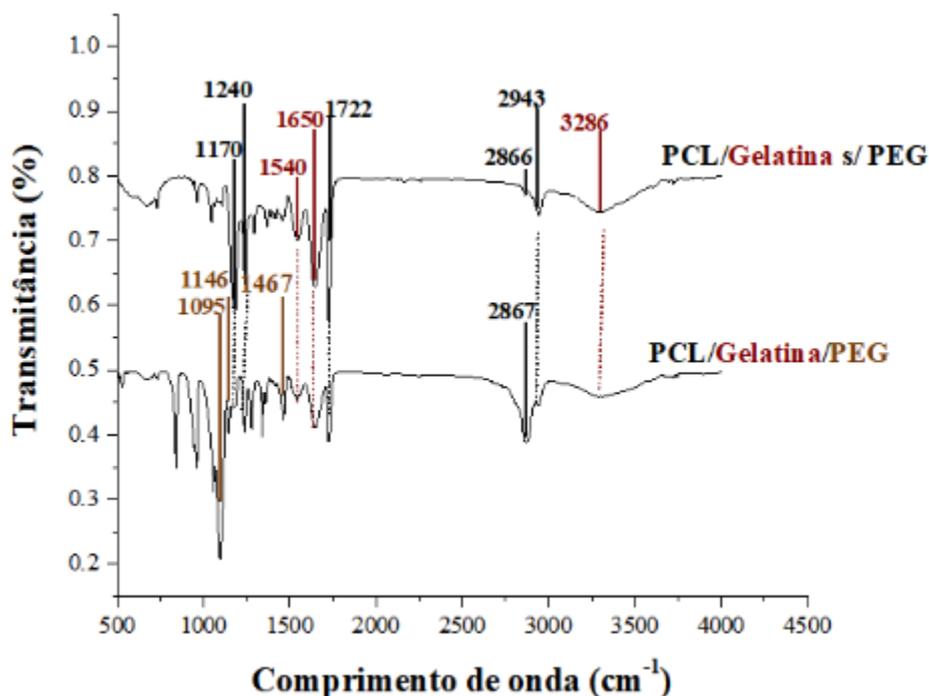


Figura 4.3. ATR-FTIR das malhas de PCL/Gelatina, PCL/Gelatina/PEG

4.2.1. Ângulos de contacto

A medição dos ângulos de contacto permitiu determinar o carácter hidrofílico/ hidrofóbico de cada um dos componentes das malhas. Para tal, diversas malhas foram testadas, nomeadamente, as malhas de PCL, PCL/Gelatina/PEG (malha antes da remoção de PEG) e PCL/Gelatina s/PEG (malha após remoção de PEG). Assim, como demonstrado na Figura 4.3, as malhas de PCL apresentam valores de ângulo de contacto na ordem dos $125 \pm 2.6^\circ$ (barra cinzenta), indicando que as malhas de PCL são altamente hidrofóbicas. Opostamente a essa situação, tem-se a gelatina que por ser altamente hidrofílica quando combinada com o PCL, tende a contrabalançar o carácter hidrofóbico do mesmo, havendo uma diminuição do ângulo de contacto de $125 \pm 2.6^\circ$ para $42 \pm 4.5^\circ$ (barra vermelha). Esta diminuição confere à malha um carácter hidrofílico, tornando-a mais adequada à adesão e crescimento celular. O mesmo caso pode ainda ser observado na malha de PCL/Gelatina/PEG, em que o ângulo de contacto médio é de $52.0 \pm 6.7^\circ$, reforçando mais uma vez a teoria de que o carácter hidrofóbico de PCL é equilibrado pela hidroflicidade da gelatina e do PEG.

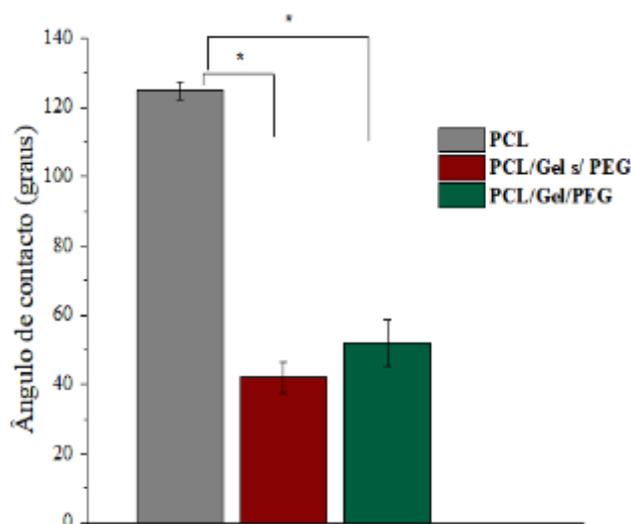


Figura 4.4. Representação gráfica dos ângulos de contacto das malhas de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG. A significância estatística é indicada por um asterisco para (* $p < 0.5$).

Estes resultados vão de encontro aos resultados de estudos realizados no mesmo âmbito, em que as malhas de PCL têm um ângulo de contacto entre 90° - 134° e as malhas de PCL:Gelatina apresentam um ângulo entre os 0° - 63.3° (referências: [73], [79], [86] e [95]). Relativamente à inserção de PEG, esperava-se que as malhas (PCL/Gelatina/PEG) apresentassem um valor de ângulo de contacto menor que a malha de PCL/Gelatina s/PEG, até porque estudos sugerem que a introdução de PEG aumenta a hidrofobicidade da malha [125,126]. No entanto, apesar dos ângulos de contacto das duas malhas não estarem muito desfasados, a ligeira discrepância sugere que a presença de PEG pouco contribuiu para a hidrofobicidade da malha, ou que os poros deixados na malha de PCL/Gelatina s/ PEG após a remoção de PEG possam ter permitido uma maior difusão de água comparativamente à malha de PCL/Gelatina/PEG.

4.2.2. Ensaio mecânico de Tração

Os ensaios de tração foram realizados sob malhas de PCL, PCL/Gelatina s/PEG e PCL/Gelatina (malhas sem incorporação de PEG) no estado seco e molhado. O estudo do comportamento mecânico das malhas no estado molhado e seco permite-nos perceber as diferenças, caso existam, na capacidade da malha de suportar forças de tração. Assim sendo, com base nas curvas de tensão-deformação das malhas secas (Figura 4.4), as malhas de PCL/Gelatina apresentaram uma resistência maior à tração, com um módulo de elasticidade de 30.0 ± 3.2 MPa, seguindo as malhas de PCL/Gelatina s/PEG de módulo de 23.7 ± 4.3 MPa e por último as malhas de PCL tendo um módulo de 11.8 ± 1.1 MPa (Figura 4.4). E quanto à deformação, as malhas de PCL/Gelatina apresentaram uma deformação máxima de 4.2 mm/mm, seguindo as malhas de

PCL/Gelatina s/PEG com 4.2 mm/mm e PCL com 4.4 mm/mm de deformação máxima. O elevado módulo de elasticidade apresentado pelas malhas de PCL/Gelatina em relação às malhas de PCL indica a elevada capacidade de deformação/elongação da gelatina, que quando combinada com PCL permite que a malha (PCL/Gelatina) suporte melhor as forças distensivas [79,84,102]. As diferenças na capacidade das malhas de PCL e PCL/Gelatina de suportarem forças distensivas também foram encontradas nos trabalhos de Zhang *et al.* (4.98MPa para PCL e 30.8MPa para PCL/Gelatina)[79]; Hwang *et al.* (3.23 ± 0.92 MPa para PCL e 24.86 ± 7.58 MPa para PCL/Gelatina)[71]; e de K.Ren *et al.* (45 MPa para PCL e 110 MPa para PCL/Gelatina)[73], reforçando assim o caráter distensivo da gelatina. O mesmo cenário é verificado nas malhas de PCL/Gelatina s/PEG, com a deformação a dever-se à porosidade da malha que permite que esta suporte melhor a deformação.

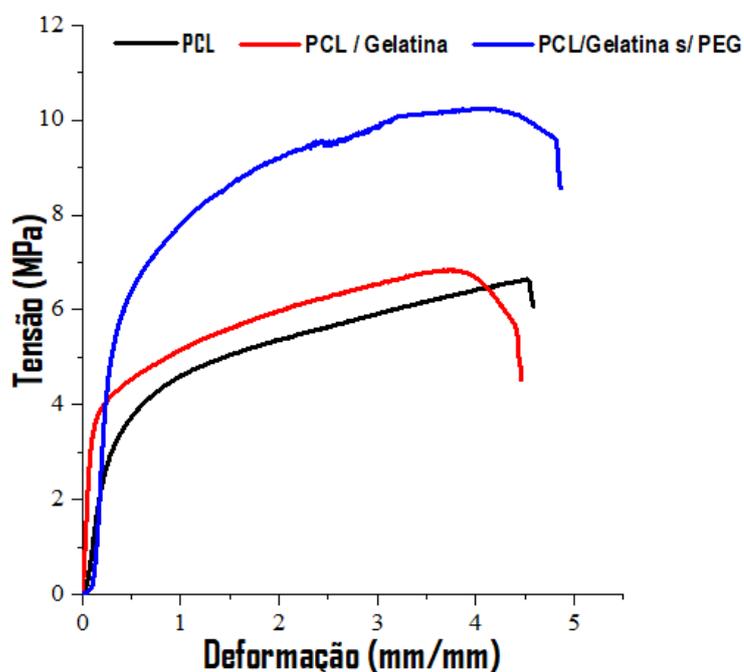


Figura 4.5. Representação gráfica das curvas de tensão-deformação da malha de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG secas.

Relativamente ao estado húmido (Figura 4.5), verificou-se que as malhas de PCL ofereciam maior resistência à tração, apresentando um módulo de elasticidade de 16.0 ± 0.9 MPa, seguida das malhas de PCL/Gelatina com um módulo de 3.5 ± 0.6 MPa e das malhas de PCL/Gelatina s/PEG com um módulo de 3.3 ± 0.4 MPa. Numa comparação com os módulos de elasticidade das malhas secas verifica-se que a presença de água altera a resistência mecânica das malhas, sendo esta alteração no sentido da redução da capacidade das malhas de suportarem forças distensivas. Embora os módulos de elasticidade diminuam, os valores de deformação indicam que a presença de gelatina aumenta a capacidade de distensão das malhas, passando esta a suporta

uma deformação máxima de 4.6 mm/mm em vez de 4.2 mm/mm no caso das malhas de PCL. Nas malhas nas malhas de PCL/Gelatina s/PEG a porosidade da malha contribui para o aumento da deformação da estrutura (4.4 mm/mm). Estes dados reforçam a teoria do PCL (polímero sintético) apresentar propriedade mecânicas adequadas ao suporte de tensões, opostamente a gelatina (polímero natural) que é caracterizada pelas fracas propriedades mecânicas, não sendo capaz de suportar tensões elevadas [121]. Contudo, apesar das pobres propriedade mecânicas da gelatina, esta confere elasticidade às malhas, permitindo que suporte taxas de deformação superiores [79,101]. No caso das malhas de PCL/Gelatina s/PEG o aumento da capacidade de deformação é um indicativo de que a porosidade intervém positivamente na deformação das malhas.

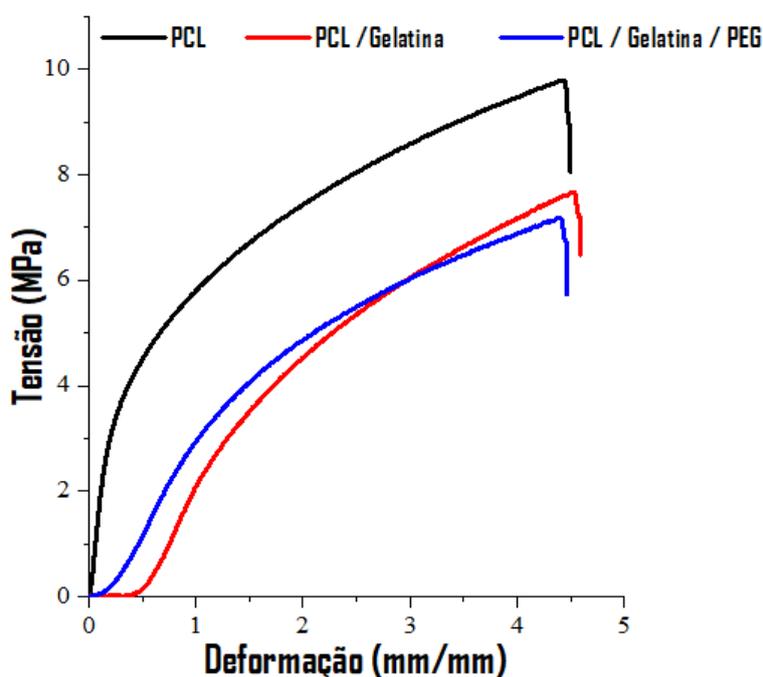


Figura 4.6. Representação gráfica das curvas de tensão- deformação da malha de PCL, PCL/Gelatina e PCL/Gelatina/PEG molhadas.

Tabela 4.2. Módulo de elasticidade e deformação das malhas no estudo de seco e molhado

		Módulo de elasticidade (MPa)	Deformação máxima (mm/mm)
Malhas molhadas	PCL	16.0 ± 0.9	4.2
	PCL/Gelatina	3.5 ± 0.6	4.6
	PCL/Gelatina s/PEG	3.3 ± 0.4	4.4
Malhas secas	PCL	11.8 ± 1.1	4.4
	PCL/Gelatina	30.0 ± 3.2	4.2
	PCL/Gelatina s/PEG	23.7 ± 4.3	4.2

Na avaliação das propriedades mecânicas dos filmes fibrosos de PCL/Gelatina, acredita-se que os dados obtidos com o ambiente húmido refletem mais de perto as condições *in vitro* e *in vivo* em comparação com o desempenho mecânico de materiais secos, e isto porque apesar dos baixos módulos de elasticidade das malhas no estado molhado, estes estão dentro do intervalo reportado como o apresentado pela cartilagem nativa (0.1-5 MPa) [94].

4.3. Caracterização dos *scaffolds*

Assim como descrito no procedimento experimental (capítulo 3), a caracterização dos *scaffolds* envolveu a avaliação da turgescência das estruturas porosas (em 4.3.1) e ensaios de compressão (em 4.3.2).

4.3.1. Turgescência dos *scaffolds*

Com base no perfil de turgescência de cada arquitetura ao longo das 72 horas (Figura 4.7), verificou-se que a arquitetura H4 apresenta uma maior capacidade de absorção de água ao longo do tempo, e isto deve-se à porosidade das camadas intermédia e profunda que permitem em grande parte a difusão do meio líquido para o interior da estrutura [122]. Este resultado vai de encontro ao trabalho de A. F. Girão *et al.*[94], com a estrutura H4 a apresentar uma taxa de turgescência superior após 24 horas de imersão em água, indicando assim que a combinação dessas duas camadas (profunda e intermédia) permitem uma maior absorção de água por parte dos *scaffolds*. No entanto, estes dados não explicam o porquê da arquitetura H2 apresentar uma taxa de absorção menor, tendo em conta que também apresenta a camada intermédia e a camada superficial apresenta a mesma porosidade que a camada profunda. Para a estrutura H2 pensa-se que a camada superficial ao ser constituída por 5 cortes dificulta a difusão de água até o interior da estrutura e que a organização em espiral da camada profunda contribua para uma maior

absorção de água por parte dos *scaffolds* H4. Um outro fator é a degradação do hidrogel devido às sucessivas pesagens. Os hidrogéis de GO-colagénio que são os responsáveis pela absorção de grande parte da água, portanto, a degradação destas estruturas influencia negativamente a capacidade dos *scaffolds* de absorverem de água. No caso da estrutura H3, a taxa de turgescência ao longo do tempo se aproxima da arquitetura H4, sugerindo que há grande difusão de água entre as camadas (superficial e profunda). Estes valores de absorção contrariam os da estrutura H2, uma vez que ambas as estruturas apresentam a camada superficial. E esta diferença pode dever-se, assim como na estrutura H4, à disposição em espiral da malha na camada profunda da arquitetura H3, que contribuiu para a difusão de água entre as dobras da malha, ou mais uma vez, à taxa de degradação dos hidrogéis dos *scaffolds* H2.

Relativamente aos *scaffolds* H1, pensa-se que o facto desta estrutura apresentar as três camadas, aumenta o tempo de difusão de água por toda a estrutura, que por sua vez, reflete-se numa reduzida taxa de absorção.

A capacidade de cartilagem reter fluído intersticial é um dos mecanismos mecânicos que lhe permite suportar cargas muitas vezes superior ao peso corporal. Assim sendo, a avaliação da capacidade de turgescência permite entender se as estruturas serão capazes de reter líquido intersticial e através deste processo ser capaz de suportar forças compressivas.

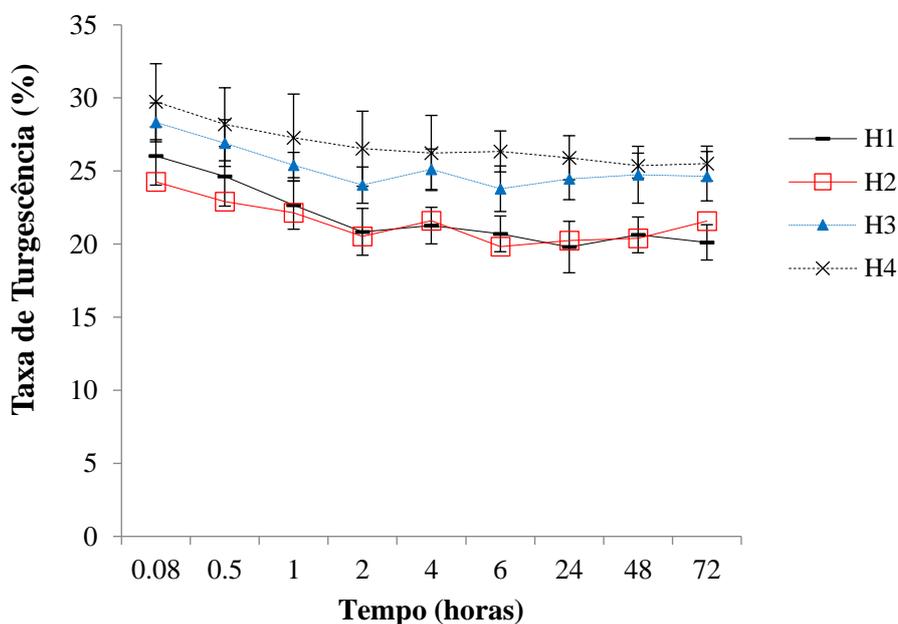


Figura 4.7. Representação gráfica de taxa de turgescência dos *scaffolds*.

4.3.2. Ensaio mecânicos de compressão

Na avaliação das estruturas anisotrópicas aos ensaios de compressão, verificou-se que a estrutura H4 apresentava uma maior resistência mecânica, com um módulo de compressão de 41.339 ± 10.166 kPa (Figura 4.9). O elevado módulo de compressão da arquitetura H4 vai de encontro com os valores da taxa de turgescência, sugerindo que a elevada absorção de água permite a estrutura resistir melhor as forças compressivas. Outro fator é a presença da camada profunda, que dada à orientação vertical das fibras permite suportar cargas compressivas [50]. A mesma analogia não pode, no entanto, ser tida em consideração para a arquitetura H3 que para uma taxa de turgescência próxima de H4 e sendo constituída pela camada profunda, apresenta um módulo de compressão inferior (26.635 ± 348 kPa). Neste caso pensa-se que o aumento da porosidade da camada profunda, com maior influência nesta arquitetura, tenha condicionado a resistência da estrutura à compressão. A disposição das fibras na camada superficial também afetou este parâmetro, e isto porque, a resistência da estrutura à compressão é menor quando a força aplica é perpendicular à orientação das fibras [94]. O mesmo cenário verificado no trabalho de A. F. Girão *et al.*[94], com a estrutura H4 a apresentar uma módulo de compressão de 85.42 ± 10.91 MPa superior a estrutura H3, que apresenta um módulo de 66.47 ± 15.49 MPa. No caso da arquitetura H2, o facto do módulo de compressão ser superior à estrutura H3, mesmo sendo constituída pela camada superficial deve-se à porosidade da camada profunda da estrutura H3, que prejudica a resistência à compressão, e à presença da camada intermédia na arquitetura H2, que ao apresentar as fibras dispostas aleatoriamente permite que a estrutura suporte um conjunto de forças, incluindo a compressão.

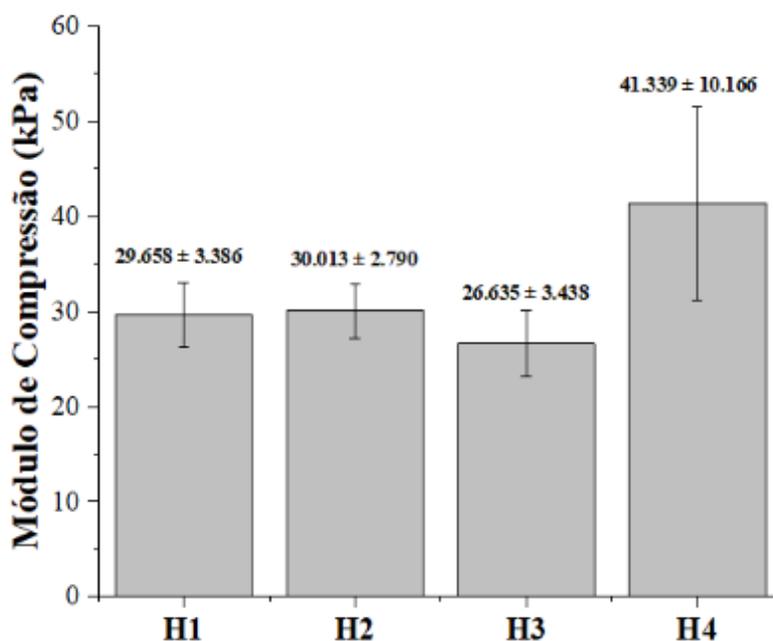


Figura 4.8. Módulos de compressão das estruturas anisotrópicas (H1, H2, H3 e H4).

Relativamente à arquitetura H1, as forças de compressão são suportadas pelas camadas intermédia e profunda, uma vez que a orientação das fibras na camada superficial apresenta baixa resistência à compressão. Esta situação conduz a uma diminuição da resistência da estrutura à compressão, bem como a diminuição do módulo de compressão.

Os dados de compressão obtidos estão de acordo com as curvas de turgescência das arquiteturas, que apesar da ligeira discrepância sugerem uma aproximação na capacidade de absorção das arquiteturas. É uma vez que a taxa de turgescência condiciona a capacidade dos *scaffolds* de suportarem forças compressivas, pode-se afirmar que a aproximação nos valores de compressão reflete a aproximação observada nas curvas de turgescência das arquiteturas. Numa comparação dos dados de compressão obtidos com estudos efetuados no mesmo âmbito, verifica-se uma enorme discrepância entre os valores. É por exemplo, o caso de McCullen *et al* que no seu trabalho, as malhas de PCL apresentam um módulo de 152.5 ± 42.2 kPa [1]. Esta discrepância pode ser explicada não só pelo aumento da porosidade resultante da utilização de um agente sacrificial – partículas de PEG, mas também pela presença de gelatina, uma vez que esta apresenta pobres propriedades mecânicas. Um outro caso é o trabalho de Steele *et al.* que apresentou módulo de compressão entre 14 - 44 kPa, estando mais abaixo dos valores apresentados por McCullen *et al*, e isto devido à porosidade da estrutura anisotrópica ou a falta de compactação/boa união entre as diferentes camadas da estrutura) [47].

Embora os valores obtidos (Figura 4.9) não estejam sempre nos intervalos dos estudos mencionados, estes aproximam-se do módulo de compressão da cartilagem nativa que é de 89.5 ± 48.6 kPa [94].

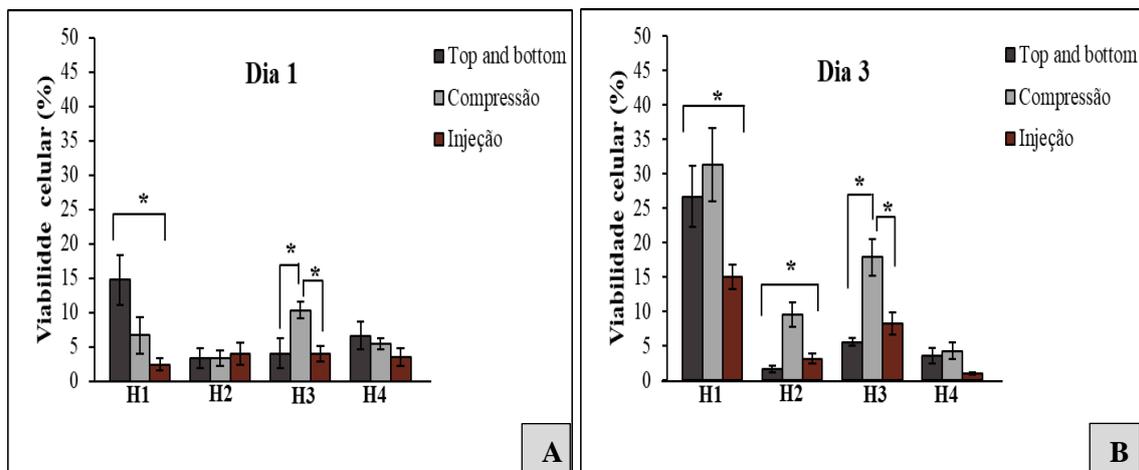
4.4. Atividade celular

Numa primeira análise da atividade metabólica das células durante os 21 dias de cultura *in vitro*, verificou-se um ligeiro aumento da viabilidade celular em todas as arquiteturas (H1, H2, H3 e H4), o que leva a concluir que as arquiteturas desenvolvidas conferem um ambiente propício à proliferação celular (Figura 4.9 A – E). No primeiro dia após a semente celular, para a arquitetura H1, as diferenças na viabilidade celular entre as técnicas de semente celular *top and bottom* e Injeção, indicam uma maior proliferação celular nos *scaffolds* cuja semente celular foi realizada por *top and bottom*. Esta diferença pode dever-se ao próprio processo de incorporação das células por Injeção, que por ser no centro dos *scaffolds*, torna difícil a quantificação das células, ou seja, o período de incubação em resazurina pode ser reduzido para a deteção das células no centro dos *scaffolds*. Ainda no 1º dia, a incorporação de células por Compressão foi a que apresentou maior viabilidade celular na arquitetura H3, sugerindo que terá havido uma maior adesão e proliferação das células incorporadas através desta técnica. Esta mesma situação foi verificada nos restantes dias, com a incorporação celular por *top and bottom* e Injeção a

apresentarem menor viabilidade celular comparativamente à Compressão. No 3º dia, as diferenças na viabilidade celular entre as técnicas *top and bottom* e Injeção são ainda verificadas na arquitetura H1, indicando que mesmo com a proliferação celular, a identificação de células incorporada por Injeção possa ter sido condicionada pela localização das mesmas no interior dos *scaffolds*. Relativamente à arquitetura H2, a reduzida atividade metabólica das células incorporadas por *top and bottom* pode dever-se à perda de células durante a cultura *in vitro*, ou seja, pode ter havido remoção de células durante o processo de troca do meio de cultura. No 7º dia, a incorporação celular por Compressão foi a que apresentou maior viabilidade celular na arquitetura H2. Já na arquitetura H1, as técnicas *top and bottom* e Compressão apresentaram uma maior atividade celular, sendo a mesma situação também verificada no 14º dia após a semente celular. Para o 14º dia, é verificada na arquitetura H4, diferenças nos valores de viabilidade celular entre as técnicas *top and bottom* e Injeção. Esta situação remete para uma maior proliferação celular nos *scaffolds* submetidos à técnica *top and bottom* ou para uma menor identificação das células sementeadas por Injeção.

Quanto ao 21º dia, tem-se uma diminuição da proliferação celular nos *scaffolds* H1 submetido à técnica *top and bottom*, e isto pode dever-se à possível produção de componentes da MEC pelas células [101,106,125].

No geral, a incorporação das células por Compressão apresentou valores mais elevados de proliferação celular em todas as arquiteturas com exceção do H4. E a arquitetura H1 foi a que teve valores de viabilidade celular mais elevados para todas as técnicas de semente celular, demonstrando que esta confere um microambiente mais favorável à proliferação celular. Pensa-se que a elevada viabilidade celular na arquitetura H1 seja devido à constituição desta estrutura, ou seja, por conter, assim como a cartilagem nativa, as três zonas da MEC, favoreça o crescimento do tecido cartilágneo.



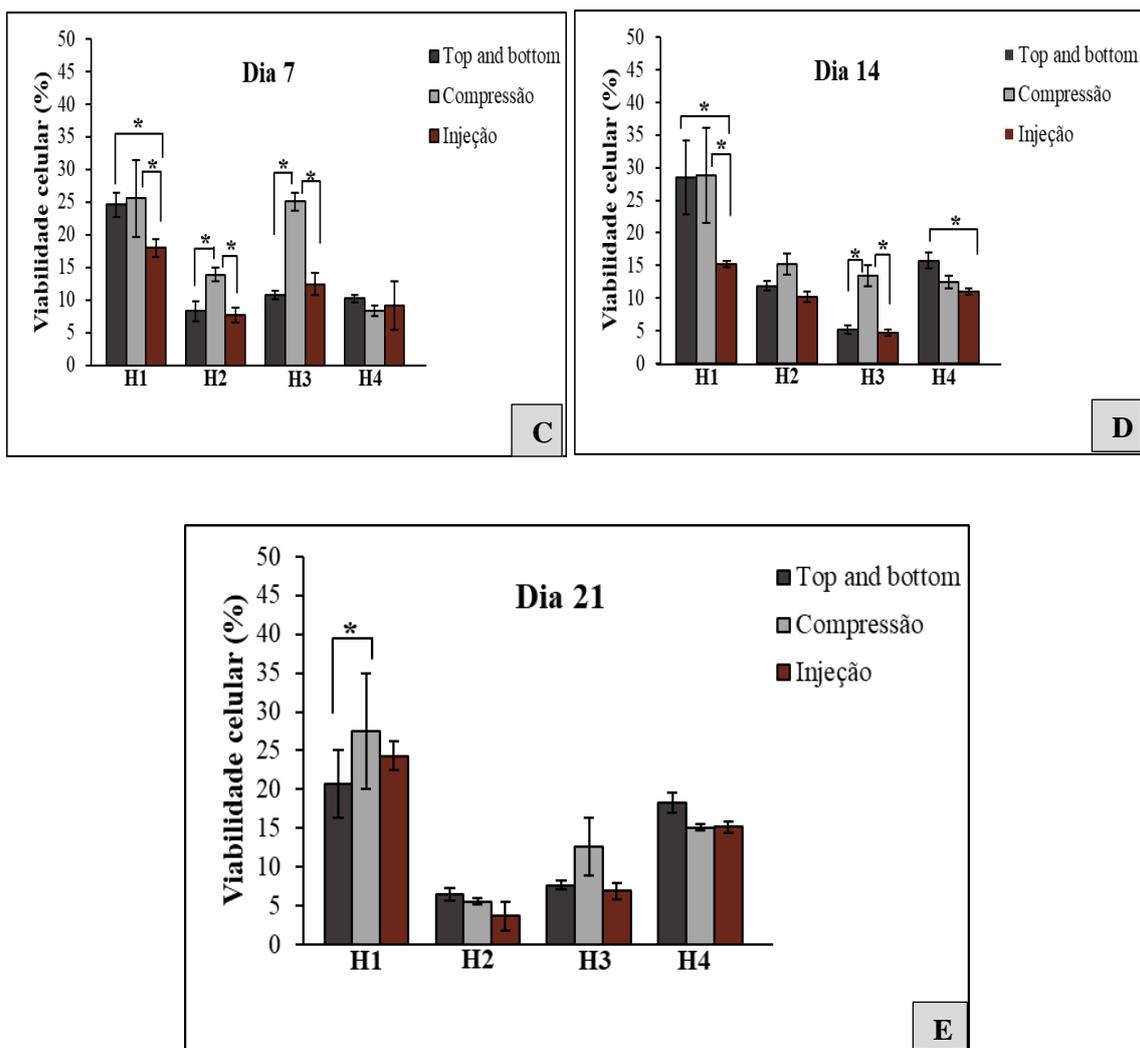


Figura 4.9. Representação gráfica da viabilidade celular nas diferentes arquiteturas (H1, H2, H3 e H4) no 1º (A), 3º (B), 7º (C), 14º (D) e 21º (E) dia após a semente celular. A significância estatística é indicada por um asterisco para (* $p < 0.5$).

4.5. Distribuição das células

Estudo imunocitoquímico

A coloração das camadas anisotrópicas permitiu identificar e avaliar a distribuição das células nas arquiteturas (H1, H2, H3 e H4) de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, *Top and bottom* e Injeção). O estudo da distribuição celular permitiu também confirmar os dados de viabilidade celular obtidos dos ensaios de resazurina. Assim sendo, na arquitetura H1 (Figura 4.10), para as secções dos *scaffolds* submetidos ao processo de semente celular por compressão, são visualizadas células em todas as camadas (superficial, intermédia e profunda), sugerindo que a técnica de semente aplicada possibilitou a incorporação das células, e que a própria porosidade da arquitetura permitiu a difusão das células. Assim, como demonstrado nas imagens de compressão da arquitetura H1, na camada superficial tem-se células

ao longo das fibras, e na camada profunda as células presentes confirmam mais uma vez a teoria da difusão das células por entre os poros das camadas. Na camada intermédia, a presença de células corrobora a teoria anterior e confirma os dados de viabilidade celular obtidos para esta arquitetura e técnica de sementeação. Para a técnica *top and bottom*, a presença de células na camada profunda indica a adesão celular, fazendo destes *scaffolds*, arquiteturas adequadas ao crescimento celular. Quanto à camada superficial, a ausência de células pode deve-se à própria secção da estrutura 3D analisada que não continha células, ou à autofluorescência da malha PCL/Gelatina s/PEG. Isto é, tanto a Gelatina como o PCL são biomateriais autofluorescentes [129],[124], logo a identificação de células nas malhas PCL/Gelatina é difícil porque em certos casos a fluorescência emitida pelas células é ofuscada pela autofluorescência dos biomateriais. Um outro fator é o tempo de incubação das células (90 minutos), que pode ser reduzido para a fixação das células nas fibras, havendo com isso perda de células durante o processo de cultura celular. Relativamente à sementeação celular por injeção, a identificação de células leva-nos a concluir que esta técnica permitiu a incorporação de células, e que os dados de viabilidade celular estão de acordo com as imagens obtidas. A identificação de células apenas na camada intermédia deve-se à extrema autofluorescência da malha nas restantes zonas da arquitetura.

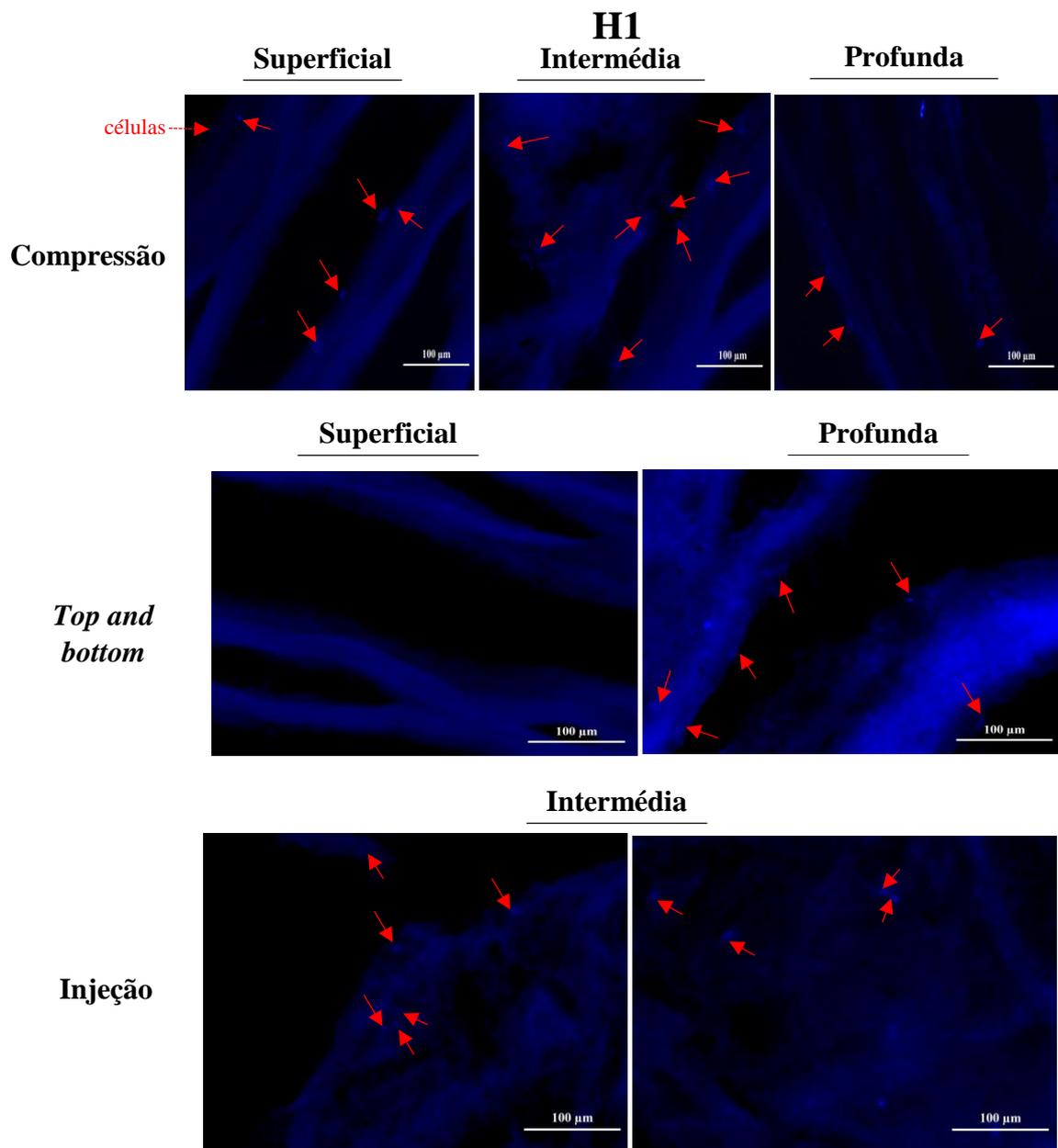


Figura 4.10. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H1 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, *Top and bottom* e Injeção)

Na arquitetura H2, a distribuição das células de acordo com as técnicas de semente pode ser visualizada na Figura 4.11. E com base nas imagens, a ausência de células nas secções da semente celular por compressão contraria os dados de viabilidade celular obtidos, que apesar de baixos indicam presença e proliferação celular. Esta situação pode dever-se às secções escolhidas que poderiam não conter células, ou a autofluorescência das malhas que dificulta a detecção de células. Pode ainda dever-se à produção de matriz extracelular, no sentido em que na camada intermédia são identificadas estruturas, que pela morfologia não podem ser células nem

“partículas externas” que possa ter aderido à malha, levando-nos assim, a concluir que sejam componentes da matriz extracelular. Uma outra explicação é a possível adesão das células aos hidrogéis, e a consequente remoção das mesmas durante o processo de colocação das secções.

No caso de *top and bottom*, na camada superficial as poucas células identificadas confirmam a baixa viabilidade celular verificada nesta arquitetura e técnica. E assim como nos restantes casos, a autofluorescência da malha dificultou a identificação de células. Relativamente à camada intermédia, a identificação de um maior número de células indica adesão e difusão celular. Na semente celular por injeção, as poucas de células encontradas na camada superficial podem dever-se novamente à secção escolhida, a autofluorescência da malha ou mesmo ao processo de incorporação celular que ao ter sido mais na camada intermédia.

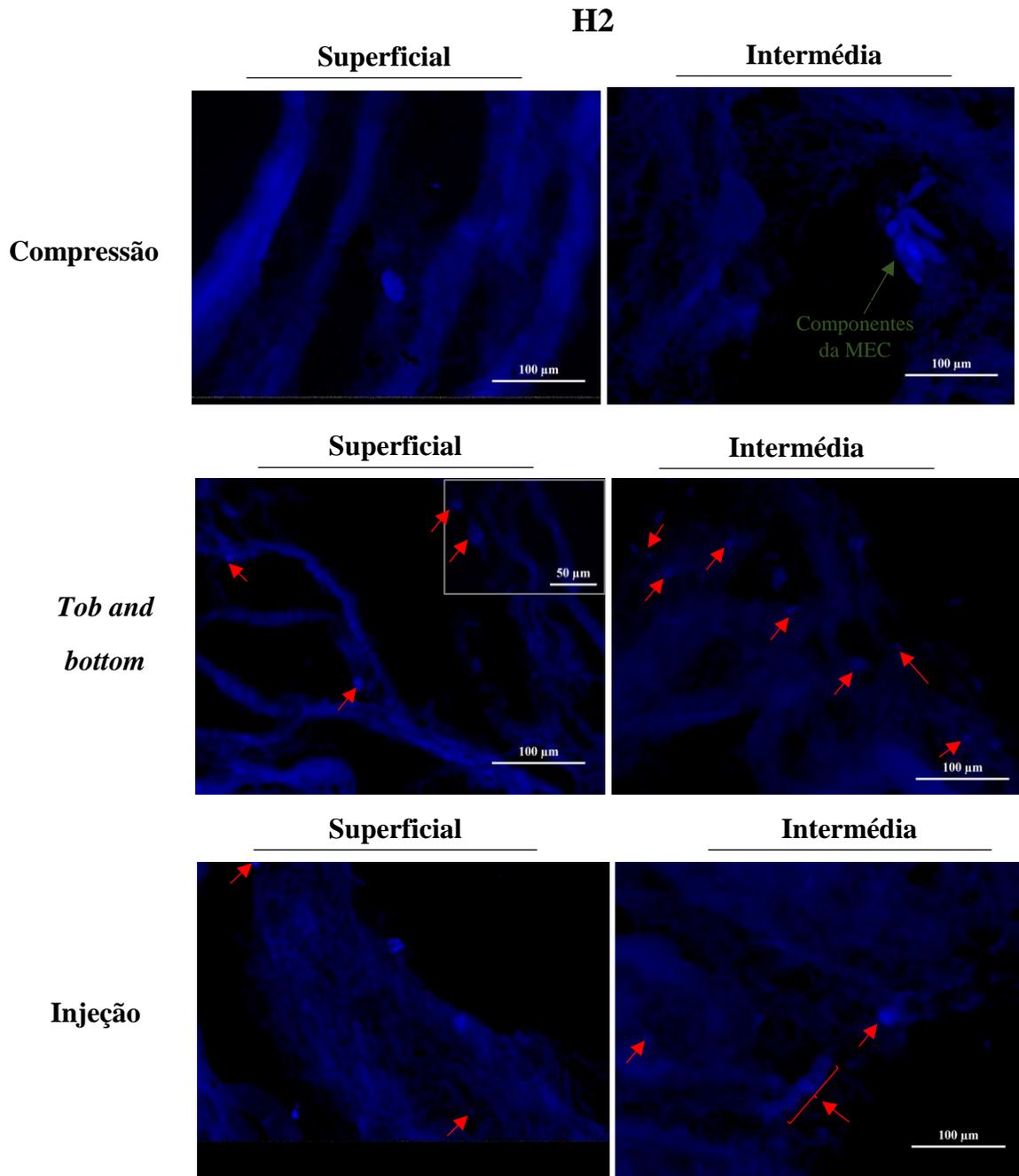


Figura 4.11. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H2 de acordo com as técnicas de sementeção celular aplicadas (Compressão, *Top and bottom* e Injeção).

Para a arquitetura H3 (Figura 4.12), a quase ausência de células na secção de sementeção celular por compressão, não está de acordo com os dados de viabilidade celular obtidos, levando-nos a concluir que a fixação aos hidrogéis conduziu à remoção das mesmas durante o processo de coloração das malhas. No caso de *top and bottom*, tem-se a disposição de células ao longo da malha e dada à extrema autofluorescência da malha não foi possível identificar células na camada profunda. As poucas células presentes na camada superficial confirmam os baixos valores de viabilidade celular obtidos. Relativamente à Injeção, as poucas células presentes na camada

profunda confirmam a baixa viabilidade celular observada nesta arquitetura. E assim como nas seções *top and bottom*, a autofluorescência das malhas impossibilitou a identificação de células na camada superficial.

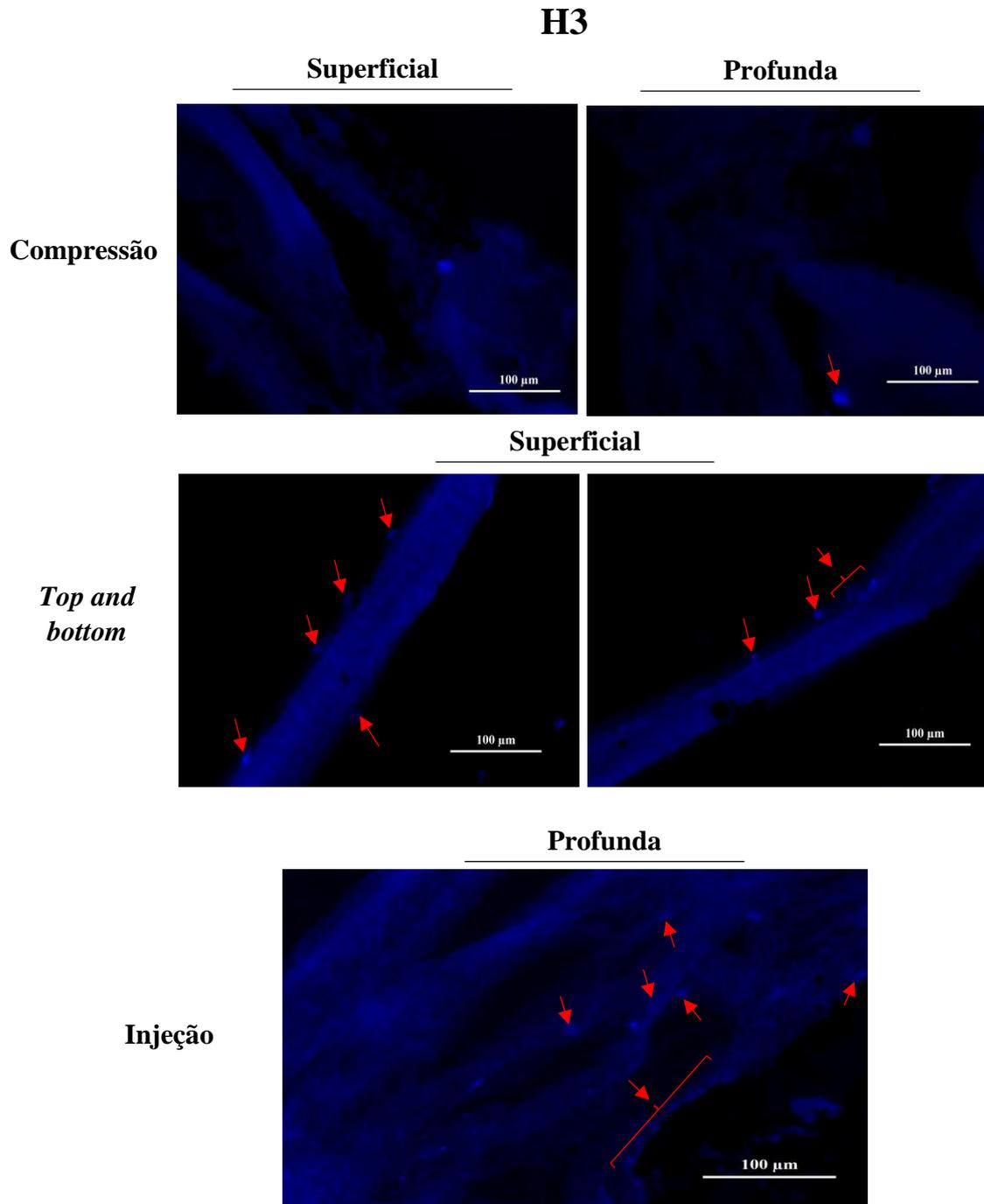


Figura 4.12. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H3 de acordo com as técnicas de semente celular aplicadas (Compressão, *Top and bottom* e Injeção)

Na arquitetura H4, assim como a arquitetura H3, as poucas células encontradas (Figura 4.13) confirmam a baixa viabilidade celular observada nesta estrutura. Nas imagens de

compressão, a fluorescência das malhas dificultou a identificação das poucas células que pudessem estar presentes nestas camadas. Assim, tal como nas secções de compressão, no *top and bottom*, a elevada fluorescência das malhas condicionou a identificação de células. Mas, na camada intermédia, o conjunto de células identificado sugere a difusão de células por entre os poros da malha. Quanto à Injeção, são identificadas entre as camadas (intermédia e profunda) possíveis aglomerados celulares, reforçando assim, a ideia de uma localização centralizada das células nos *scaffolds*.

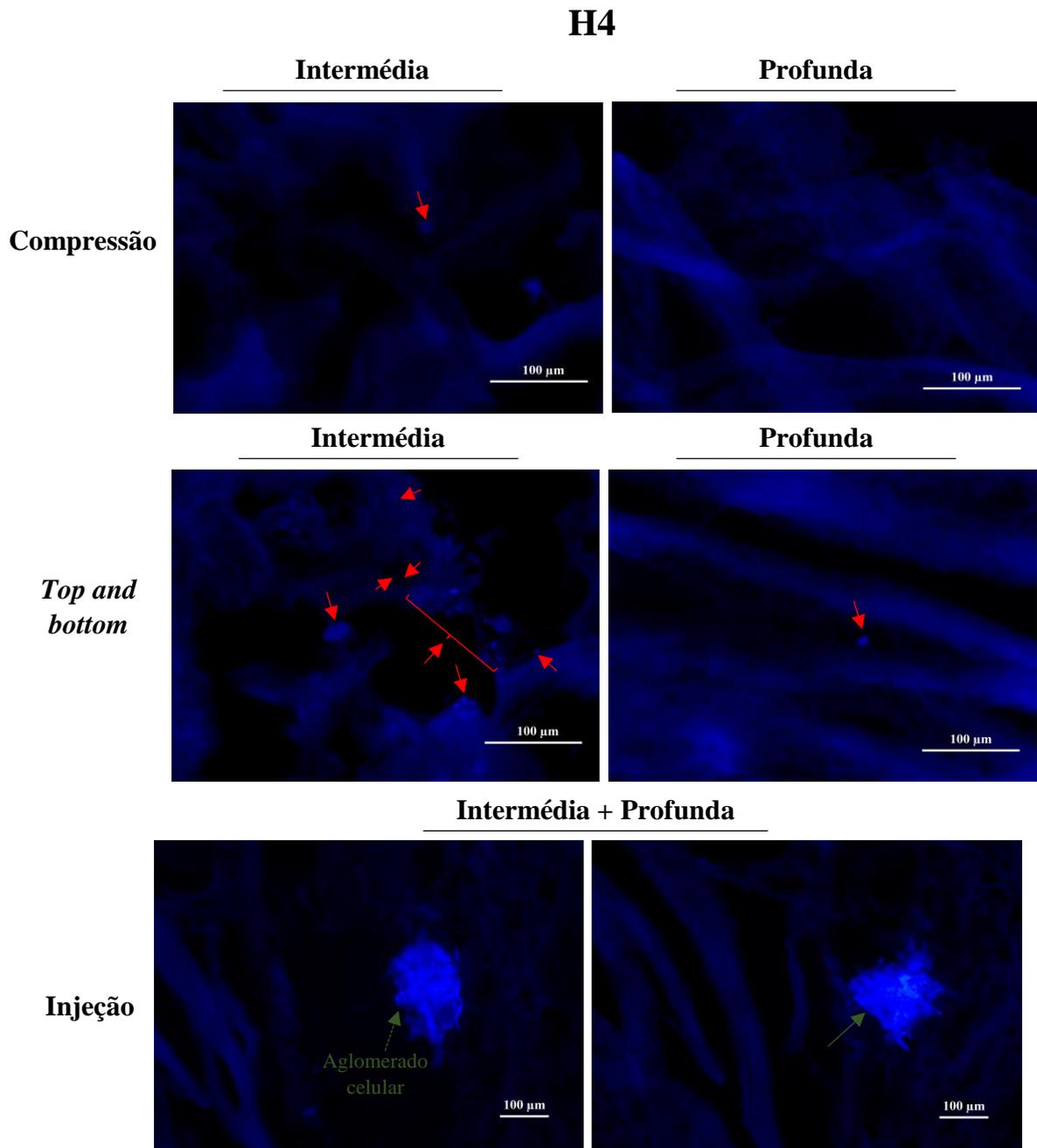


Figura 4.13. Imagens do estudo imunocitoquímico dos núcleos celulares. Distribuição das células na arquitetura H4 de acordo com as técnicas de sementeção celular aplicadas (Compressão, *Top and bottom* e Injeção)

Outro aspeto importante é a porosidade das camadas, que mesmo os *scaffolds* tendo demonstrado uma porosidade média que permite a incorporação e difusão das células, nem todos os poros possuem dimensão adequada à difusão de células. Por as células da cartilagem apresentarem uma dimensão entre 10-12 μm , pensa-se que poros de dimensão inferior possam ter dificultado a migração das células. Sendo por isso necessário assegurar que toda a arquitetura anisotrópica tenha poros de dimensão adequada à difusão.

5 - CONCLUSÃO E DESENVOLVIMENTOS FUTUROS

Nesta dissertação, procurou-se através do desenvolvimento de *scaffolds* anisotrópicos de PCL/Gelatina e com recurso a técnicas de sementeção celular estática recriar a matriz extracelular do tecido cartilágneo. Quando se pensa na sementeção de células em estruturas 3D porosas, problemas como a porosidade dos *scaffolds* e a distribuição uniforme das células ao longo das estruturas têm sido determinantes no processo de formação de um novo tecido. Como forma de solucionar estes problemas, arquiteturas anisotrópicas foram desenvolvidas com porosidade aumentada e testadas mecanica e biologicamente de forma a avaliar a capacidade das mesmas no suporte de cargas e na proliferação das células da cartilagem. Assim sendo, com base dos resultados obtidos conclui-se que a incorporação de PEG seguida da remoção do mesmo contribuiu para o aumento da porosidade da malha. E associado à remoção do PEG, o processo de hidratação das malhas contribuiu de igual modo para porosidade das estruturas anisotrópicas.

Relativamente ao comportamento mecânico dos *scaffolds*, conclui-se que a presença de gelatina, assim como de PEG conferiu carácter hidrofílico à estrutura, e isto é verificado com a diminuição do ângulo de contato das malhas de PCL/Gelatina/PEG e PCL/Gelatina s/PEG abaixo dos 90°. Esta hidroflicidade das malhas contribuiu também para o aumento da capacidade de turgescência dos *scaffolds* e com isso, a resistência dos *scaffolds* às forças de compressão. Contudo, a presença de Gelatina induziu uma redução no módulo de elasticidade das malhas molhadas, e isto devido às fracas propriedades mecânicas da Gelatina. Mas, ao mesmo tempo que se verifica uma diminuição do módulo de elasticidade das malhas de PCL/Gelatina com e sem PEG tem-se um aumento da de deformação das mesmas, sublinhando assim a capacidade de “distensão” da Gelatina e do PEG. No caso das malhas de PCL/Gelatina s/PEG, o aumento da deformação deveu-se ao carácter distensivo da Gelatina e principalmente à porosidade da malha.

Os valores de viabilidade celular demonstram que as arquiteturas anisotrópicas de PCL/Gelatina s/PEG permitiram a adesão e proliferação celular. Os *scaffolds* H1 ao apresentar uma maior atividade celular para todas as técnicas de sementeção indica a preferência das células, fazendo desta arquitetura a mais indicada para o crescimento do tecido cartilágneo.

Na avaliação da distribuição das células, as células identificadas nas secções corroboram os dados da viabilidade celular obtidos e indicam a difusão de células para as camadas adjacentes. A presença de células nas camadas é um indicativo de que a porosidade dos *scaffolds* permite a incorporação e difusão das células por entre as camadas.

Ainda que, as metodologias apresentadas nesta dissertação representem um passo para solução ou resolução do problema da sementeção de células em estruturas 3D porosas, existe ainda

espaço para melhorias e novas aplicações. Nesse sentido, destacam-se certos aspetos que futuramente poderão ser aplicados, por exemplo:

- A variação da densidade celular e avaliação do comportamento celular nas arquiteturas de acordo com essas variações;

- Por a fixação das células ocorrer também nos hidrogéis, e ainda que esta condição não condicione a proliferação das mesmas, a adesão das células apenas nas malhas permitirá que a proliferação, bem como o crescimento do tecido decorra segundo a organização/orientação das fibras. Assim, a fixação das camadas sem os hidrogéis poderá ser uma opção a se considerar no futuro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. D. McCullen, H. Autefage, A. Callanan, E. Gentleman, and M. M. Stevens, “Anisotropic Fibrous Scaffolds for Articular Cartilage Regeneration,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 18, no. 19–20, pp. 2073–2083, 2012.
- [2] T. M. Simon and D. W. Jackson, “Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options,” *Sport. Med. Arthrosc.*, vol. 14, no. 3, pp. 146–154, Sep. 2006.
- [3] D. Lees and P. Partington, “Articular cartilage,” *Orthop. Trauma*, vol. 30, no. 3, p. 8, 2016.
- [4] H. I. Roach and S. Tilley, “The Pathogenesis of Osteoarthritis,” in *Bone and Osteoarthritis*, 1st ed., F. Bronner and M. C. Farach-Carson, Eds. London: Springer, 2007, pp. 1–18.
- [5] Á. Berta, Z. Duska, F. Tóth, and L. Hangody, “Clinical experiences with cartilage repair techniques: outcomes, indications, contraindications and rehabilitation,” *Eklem Hast. Cerrahisi*, vol. 26, no. 2, pp. 84–96, 2015.
- [6] G. D. Abrams, N. A. Mall, L. A. Fortier, B. L. Roller, and B. J. Cole, “BioCartilage: Background and Operative Technique,” *Oper. Tech. Sports Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 116–124, 2013.
- [7] D. Correa and S. A. Lietman, “Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 67–77, Feb. 2017.
- [8] L. Tan, Y. Ren, and R. Kuijjer, “A 1-min Method for Homogenous Cell Seeding in Porous Scaffolds,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 26, no. 7, pp. 877–889, 2012.
- [9] J. C. Bernhard and G. Vunjak-Novakovic, “Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration?,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, no. 56, p. 9, 2016.
- [10] M. W. Kessler and D. A. Grande, “Tissue engineering and cartilage,” *Bioscience*, vol. 4, no. 1, pp. 28–32, 2008.
- [11] D. I. Braghirolli, F. Zamboni, G. A. X. Acasigua, and P. Pranke, “Association of electrospinning with electrospaying: A strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 5159–5170, 2015.
- [12] A. Baji, Y.-W. Mai, S.-C. Wong, M. Abtahi, and P. Chen, “Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties,” *Compos.*

Sci. Technol., vol. 70, no. 5, pp. 703–718, May 2010.

- [13] A. T. Buizer, A. G. Veldhuizen, S. K. Bulstra, and R. Kuijer, “Static versus vacuum cell seeding on high and low porosity ceramic scaffolds,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 29, no. 1, pp. 3–13, 2014.
- [14] A. Hadjizadeh and C. J. Doillon, “A comparative study of seeding techniques and three-dimensional matrices for mesenchymal cell attachment,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 4, no. 7, pp. 524–531, 2010.
- [15] G. A. Villalona *et al.*, “Cell-seeding techniques in vascular tissue engineering,” *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 16, no. 3, pp. 341–50, 2010.
- [16] T. Hasegawa *et al.*, “Efficient cell-seeding into scaffolds improves bone formation,” *J. Dent. Res.*, vol. 89, no. 8, pp. 854–859, 2010.
- [17] I. Torigoe *et al.*, “Novel cell seeding system into a porous scaffold using a modified low-pressure method to enhance cell seeding efficiency and bone formation,” *Cell Transplant.*, vol. 16, no. 7, pp. 729–739, 2007.
- [18] G. da Costa Ramalho, “Desenvolvimento e otimização de estruturas porosas de PCL por electrofiação para engenharia de tecidos da cartilagem,” Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, 2017.
- [19] A. Maroudas, E. Wachtel, G. Grushko, E. P. Katz, and P. Weinberg, “The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage,” *BBA - Gen. Subj.*, vol. 1073, no. 2, pp. 285–294, 1991.
- [20] J. C. Machado Ferreira, “Caracterização das propriedades mecânicas das cartilagens do joelho e da sua interação com os tecidos circundantes,” Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2015.
- [21] A. Completo and F. Fonseca, *Fundamentos de Biomecânica músculo- esquelética e ortopédica*. Lisboa: Publindustria, 2011.
- [22] A. R. Phull, S. H. Eo, Q. Abbas, M. Ahmed, and S. J. Kim, “Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016.
- [23] L. Kock, C. C. Van Donkelaar, and K. Ito, “Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status,” *Cell Tissue Res.*, vol. 347, no. 3, pp. 613–627, 2012.
- [24] M. Huber, S. Tratting, and F. Lintner, “Anatomy, Biochemistry, and Physiology of Articular Cartilage,” *Invest. Radiol.*, vol. 35, no. 10, pp. 573–580, 2000.

- [25] Y. Xia, E. M. Darling, and W. Herzog, "Functional Properties of Chondrocytes and Articular Cartilage using Optical Imaging to Scanning Probe Microscopy," *J. Orthop. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 620–631, 2018.
- [26] S. J. Abbass, E. Farah, and M. Reda, "Finite Element Analysis of Human and Artificial Articular Cartilage," *J. Eng.*, vol. 18, no. 4, pp. 443–458, 2012.
- [27] L. T. Brody, "Masterclass Knee osteoarthritis: Clinical connections to articular cartilage structure and function," *Phys. Ther. Sport*, vol. 16, no. 4, pp. 301–316, 2015.
- [28] R. M. Schulz and A. Bader, "Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes," *Eur. Biophys. J.*, vol. 36, no. 4–5, pp. 539–568, 2007.
- [29] P. A. Torzilli, "Influence of cartilage conformation on its equilibrium water partition," *J. Orthop. Res.*, vol. 3, no. 4, pp. 473–483, 1985.
- [30] V. C. Mow, A. Ratcliffe, and S. L.-Y. Woo, "Biomechanics of Diarthrodial Joints." [Online]. Available: <https://books.google.pt/books?id=laDSBwAAQBAJ&pg=PR10&dq=Bio-Tribology+of+Natural+and+Replacement+Synovial+Joints,+in+Biomechanics+of+diarthrodial+joints&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwj3wa3vp7jbAhVC1hQKHVS1BwEQ6AEIKDAA#v=onepage&q=pore&f=false>. [Accessed: 03-Jun-2018].
- [31] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, and S. A. Rodeo, "The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function," *Sports Health*, vol. 1, no. 6, pp. 461–468, 2009.
- [32] D. Milentijevic, D. L. Helfet, and P. A. Torzilli, "Influence of Stress Magnitude on Water Loss and Chondrocyte Viability in Impacted Articular Cartilage," *J. Biomech. Eng.*, vol. 125, no. 5, p. 594, 2003.
- [33] A. Mobasheri, G. Kalamegam, G. Musumeci, and M. E. Batt, "Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions," *Maturitas*, vol. 78, no. 3, pp. 188–198, 2014.
- [34] J. A. Buckwalter, H. J. Mankin, and A. J. Grodzinsky, "Articular cartilage and osteoarthritis," *Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 54, pp. 465–480, 2005.
- [35] H. Muir, "The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules," *BioEssays*, vol. 17, no. 12, pp. 1039–1048, 1995.

- [36] R. G. Lebaron and K. A. Athanasiou, “Ex vivo synthesis of articular cartilage,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2575–2587, 2000.
- [37] L. Kjellén and U. Lindahl, “Proteoglycans: Structures and Interactions,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 443–475, 1991.
- [38] S. Chen, P. Fu, R. Cong, H. S. Wu, and M. Pei, “Strategies to minimize hypertrophy in cartilage engineering and regeneration,” *Genes Dis.*, vol. 2, no. 1, pp. 76–95, 2015.
- [39] A. J. Steward, Y. Liu, and D. R. Wagner, “Engineering Cell attachments to Scaffolds in Cartilage tissue engineering,” *Jom*, vol. 63, no. 4, pp. 74–82, 2011.
- [40] V. C. Mow, M. H. Holmes, and W. Michael Lai, “Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review,” *J. Biomech.*, vol. 17, no. 5, pp. 377–394, 1984.
- [41] J. Watkins, *Estrutura e Função do Sistema Musculoesquelético*. Brasil: Porto Alegre:ARTMED, 2001.
- [42] A. R. Poole, T. Kojima, T. Yasuda, F. Mwale, M. Kobayashi, and S. Laverty, “Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 1, no. 391, pp. S26–S33, 2001.
- [43] L. Han, A. J. Grodzinsky, and C. Ortiz, “Nanomechanics of the Cartilage Extracellular Matrix,” *Annual review of materials research*, vol. 41, pp. 133–168, 2011.
- [44] P. Fratzl, “Collagen: Structure and mechanics, an introduction,” in *Collagen: Structure and Mechanics*, P. Fratzl, Ed. New York: Springer Science+Business Media, 2008, p. 516.
- [45] V. C. Mow, S. C. Kuei, W. M. Lai, and C. G. Armstrong, “Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 102, no. 1, p. 73, 1980.
- [46] T.-K. Kim *et al.*, “Experimental Model for Cartilage Tissue Engineering to Regenerate the Zonal Organization of Articular Cartilage,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 11, pp. 653–664, 2003.
- [47] J. A. M. Steele *et al.*, “Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 10, no. 5, pp. 2065–2075, 2014.
- [48] D. Correa and S. A. Lietman, “Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 62, pp. 67–77, 2017.
- [49] L. Yin *et al.*, “Characterization and application of size-sorted zonal chondrocytes for articular cartilage regeneration,” *Biomaterials*, vol. 165, pp. 66–78, 2018.

- [50] R. Fujioka, T. Aoyama, and T. Takakuwa, "The layered structure of the articular surface," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 21, no. 8, pp. 1092–1098, 2013.
- [51] C. Chung and J. A. Burdick, "Engineering cartilage tissue," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 2, pp. 243–262, 2007.
- [52] M. T. Nieminen, J. T. O. As, M. S. Laasanen, J. Silvennoinen, H. J. Helminen, and J. S. Jurvelin, "Prediction of biomechanical properties of articular cartilage with quantitative magnetic resonance imaging," *J. Biomech.*, vol. 37, pp. 321–328, 2004.
- [53] J. M. Mansour, "Biomechanics of Cartilage," in *Kinesiology: the mechanics and pathomechanics of human movement*, D. R. Keskula, Ed. Philadelphia: PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2003, pp. 66–75.
- [54] V. C. Mow and X. E. Guo, "Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 4, no. 1, pp. 175–209, 2002.
- [55] W. M. Lai, J. S. Hou, and V. C. Mow, "A Triphasic Theory for the Swelling and Deformation Behaviors of Articular Cartilage," *J. Biomech. Eng.*, vol. 113, no. 3, pp. 245–258, 1991.
- [56] P. Orth, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, H. Madry, and M. Cucchiari, "Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair," *Dove Press*, 2014. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897321/pdf/sccaa-7-001.pdf>. [Accessed: 13-Mar-2018].
- [57] R. Rambani and R. Venkatesh, "Current concepts in articular cartilage repair," *Arthrosc. Jt. Surg.*, vol. 1, no. 2, pp. 59–65, 2014.
- [58] C. Frota and S. Laurino, "Atualização em Ortopedia e Traumatologia do Esporte," *ResearchGate*, 2010. .
- [59] J. A. Buckwalter, "Articular cartilage injuries.," *Clinical orthopaedics and related research*, no. 402. pp. 21–37, Sep-2002.
- [60] A. Gobbi, P. Nunag, and K. Malinowski, "Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes," *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.*, vol. 13, no. 3, pp. 213–221, 2005.
- [61] Y. Liu, G. Zhou, and Y. Cao, "Recent Progress in Cartilage Tissue Engineering—Our Experience and Future Directions," *Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 28–35, 2017.
- [62] V. Rai, M. F. Dilisio, N. E. Dietz, and D. K. Agrawal, "Recent strategies in cartilage repair:

- A systemic review of the scaffold development and tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, no. 8, pp. 2343–2354, 2017.
- [63] C. Zhao *et al.*, “Articular cartilage generation applying PEG-LA-DM/PEGDM copolymer hydrogels,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 17, no. 1, 2016.
- [64] V. Guarino, M. Alvarez-Perez, V. Cirillo, and L. Ambrosio, “hMSC interaction with PCL and PCL/gelatin platforms: A comparative study on films and electrospun membranes,” *Bioact. Compat. Polym.*, vol. 26, no. 2, pp. 144–160, 2011.
- [65] H. Tian, Z. Tang, X. Zhuang, X. Chen, and X. Jing, “Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 2, pp. 237–280, 2012.
- [66] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, 2007.
- [67] D. W. Hutmacher, “Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 24, pp. 2529–2543, 2000.
- [68] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, and J. M. Kenny, “Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 11, pp. 2126–2146, 2010.
- [69] M. Swetha, K. Sahithi, A. Moorthi, N. Srinivasan, K. Ramasamy, and N. Selvamurugan, “Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 1, pp. 1–4, 2010.
- [70] D. Puppi, F. Chiellini, A. M. Piras, and E. Chiellini, “Polymeric materials for bone and cartilage repair,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 4, pp. 403–440, 2010.
- [71] P. T. Hwang *et al.*, “Poly(E-caprolactone)/gelatin composite electrospun scaffolds with porous crater-like structures for tissue engineering,” *J Biomed Mater Res Part A J Biomed Mater Res Part A*, vol. 104, no. 1, pp. 1017–1029, 2016.
- [72] P. A. Gunatillake, R. Adhikari, and N. Gadegaard, “Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–16, 2003.
- [73] K. Ren, Y. Wang, T. Sun, W. Yue, and H. Zhang, “Electrospun PCL/gelatin composite nanofiber structures for effective guided bone regeneration membranes,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 324–332, Sep. 2017.
- [74] D. W. Hutmacher, T. Schantz, I. Zein, K. W. Ng, S. H. Teoh, and K. C. Tan, “Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated

- via fused deposition modeling,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 55, no. 2, pp. 203–216, May 2001.
- [75] K. Kyriakidou *et al.*, “Dynamic Co-Seeding of Osteoblast and Endothelial Cells on 3D Polycaprolactone Scaffolds for Enhanced Bone Tissue Engineering,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 23, no. 3, pp. 227–243, 2008.
- [76] A. K. Mohanty, M. Misra, and G. Hinrichsen, “Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 276–277, pp. 1–24, 2000.
- [77] C. Choong, J. T. Triffitt, and Z. F. Cui, “Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 82, no. 2, pp. 117–125, 2004.
- [78] E. J. Chong *et al.*, “Evaluation of electrospun PCL/gelatin nanofibrous scaffold for wound healing and layered dermal reconstitution,” *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 3 SPEC. ISS., pp. 321–330, 2007.
- [79] Y. Zhang, H. Ouyang, T. L. Chwee, S. Ramakrishna, and Z. M. Huang, “Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 72, no. 1, pp. 156–165, 2005.
- [80] S. Gautam, A. K. Dinda, and N. C. Mishra, “Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, pp. 1228–1235, 2013.
- [81] E. Zahedi, S. Ansari, B. M. Wu, S. Bencharit, and A. Moshaverinia, *Hydrogels in craniofacial tissue engineering*. Elsevier Ltd, 2017.
- [82] J. L. Escobar Ivirico, M. Bhattacharjee, E. Kuyinu, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, “Regenerative Engineering for Knee Osteoarthritis Treatment: Biomaterials and Cell-Based Technologies,” *Engineering*, vol. 3, no. 1, pp. 16–27, Feb. 2017.
- [83] T. Serra, “Development of 3D-printed biodegradable composite scaffolds for tissue engineering applications,” vol. 1, p. 1 recurs electrònic (177), 2014.
- [84] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, pp. 325–347, 2010.
- [85] A. Baji, Y.-W. Mai, S.-C. Wong, M. Abtahi, and P. Chen, “Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 70, pp. 703–718, 2010.
- [86] A. Cipitria, A. Skelton, T. R. Dargaville, P. D. Dalton, and D. W. Hutmacher, “Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - A review,” *J. Mater.*

Chem., vol. 21, no. 26, pp. 9419–9453, 2011.

- [87] Y. Li, “Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 337–350, 2013.
- [88] G. H. Kim, “Electrospun PCL nanofibers with anisotropic mechanical properties as a biomedical scaffold,” *Biomed. Mater.*, vol. 3, no. 2, p. 25010, 2008.
- [89] C. Zhou *et al.*, “Combination of fused deposition modeling and gas foaming technique to fabricated hierarchical macro/microporous polymer scaffolds,” *Mater. Des.*, vol. 109, pp. 415–424, Nov. 2016.
- [90] J. Rnjak-Kovacina and A. S. Weiss, “Increasing the Pore Size of Electrospun Scaffolds,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 17, no. 5, pp. 365–372, 2011.
- [91] J. Xue *et al.*, “Engineering ear-shaped cartilage using electrospun fibrous membranes of gelatin/polycaprolactone,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 11, pp. 2624–2631, 2013.
- [92] M. A. Accardi *et al.*, “Effects of Fiber Orientation on the Frictional Properties and Damage of Regenerative Articular Cartilage Surfaces,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 19–20, pp. 2300–2310, 2013.
- [93] J. K. Wise, A. L. Yarin, C. M. Megaridis, and M. Cho, “Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Oriented Nanofibrous Scaffolds: Engineering the Superficial Zone of Articular Cartilage,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 4, pp. 913–921, 2009.
- [94] A. F. Girão, Â. Semitela, G. Ramalho, A. Completo, and P. A. A. P. Marques, “Mimicking nature: Fabrication of 3D anisotropic electrospun polycaprolactone scaffolds for cartilage tissue engineering applications,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 154, pp. 99–107, 2018.
- [95] R. Zheng *et al.*, “The influence of Gelatin/PCL ratio and 3-D construct shape of electrospun membranes on cartilage regeneration,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 1, pp. 152–164, 2014.
- [96] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, “Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 34, pp. 4532–4539, 2008.
- [97] W.-J. Li, K. G. Danielson, P. G. Alexander, and R. S. Tuan, “Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 67A, no. 4, pp. 1105–1114, Dec. 2003.
- [98] Z. Z. Zhang, D. Jiang, S. J. Wang, Y. S. Qi, J. Y. Zhang, and J. K. Yu, “Potential of

- Centrifugal Seeding Method in Improving Cells Distribution and Proliferation on Demineralized Cancellous Bone Scaffolds for Tissue-Engineered Meniscus,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 28, pp. 15294–15302, 2015.
- [99] W. Dai, J. Dong, G. Chen, and T. Uemura, “Application of low-pressure cell seeding system in tissue engineering,” *Biosci. Trends*, vol. 3, no. 6, pp. 216–219, 2009.
- [100] H. Baskaran, D. Ph, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, and J. F. Welter, “A Rapid Seeding Technique for the Assembly of Large Cell / Scaffold Composite Constructs,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 7, pp. 1851–1863, 2006.
- [101] A. F. Girão *et al.*, “Electrostatic self-assembled graphene oxide-collagen scaffolds towards a three-dimensional microenvironment for biomimetic applications,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 54, pp. 1–18, 2016.
- [102] D. I. GmbH, “OCA Optical contact angle measuring and contour analysis systems - DataPhysics.” [Online]. Available: <https://www.dataphysics-instruments.com/products/oca/>. [Accessed: 14-Aug-2018].
- [103] J. O’Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, “Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 17, pp. 5421–5426, 2000.
- [104] S. Hamada and S. Fujita, “DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry,” *Histochemistry*, vol. 79, no. 2, pp. 219–226, 1983.
- [105] B. I. Tarnowski, F. G. Spinale, and J. H. Nicholson, “DAPI as a useful stain for nuclear quantitation,” *Biotech. Histochem.*, vol. 66, no. 6, pp. 296–302, 1991.
- [106] D. Li *et al.*, “A comparison of nanoscale and multiscale PCL/gelatin scaffolds prepared by disc-electrospinning,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 146, pp. 632–641, 2016.
- [107] D. Gupta *et al.*, “Aligned and random nanofibrous substrate for the in vitro culture of Schwann cells for neural tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 7, pp. 2560–2569, 2009.
- [108] S. Zhong, Y. Zhang, and C. T. Lim, “Fabrication of Large Pores in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cellular Infiltration: A Review,” *Tissue Eng. Part B Rev.*, vol. 18, no. 2, pp. 77–87, 2012.
- [109] B. M. Baker *et al.*, “The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 15, pp. 2348–2358, 2008.

- [110] B. M. Whited, J. R. Whitney, M. C. Hofmann, Y. Xu, and M. N. Rylander, "Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds," *Biomaterials*, vol. 32, no. 9, pp. 2294–2304, 2011.
- [111] K. Wang *et al.*, "Improvement of cell infiltration in electrospun polycaprolactone scaffolds for the construction of vascular grafts," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 10, no. 8, 2014.
- [112] W. Yang, F. Yang, Y. Wang, S. K. Both, and J. A. Jansen, "In vivo bone generation via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4505–4512, 2013.
- [113] E. Kostakova, M. Seps, P. Pokorny, and D. Lukas, "Study of polycaprolactone wet electrospinning process," *Express Polym. Lett.*, vol. 8, no. 8, pp. 554–564, 2014.
- [114] R. A. Stockwell, "Biology of Cartilage Cells," 1979. [Online]. Available: [https://books.google.pt/books?id=oAA9AAAIAAJ&pg=PA25&lpg=PA25&dq=chondrocyte+dimensions&source=bl&ots=l2znjHo6O4&sig=FiHICzCyIUnjxsh4s7irABPgKJg&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwjYg9ren9fdAhXkAsAKHfD9D-gQ6AEwCXoECAUQAQ#v=onepage&q=chondrocyte dimensions&f=false](https://books.google.pt/books?id=oAA9AAAIAAJ&pg=PA25&lpg=PA25&dq=chondrocyte+dimensions&source=bl&ots=l2znjHo6O4&sig=FiHICzCyIUnjxsh4s7irABPgKJg&hl=pt-PT&sa=X&ved=2ahUKEwjYg9ren9fdAhXkAsAKHfD9D-gQ6AEwCXoECAUQAQ#v=onepage&q=chondrocyte%20dimensions&f=false). [Accessed: 26-Sep-2018].
- [115] L. H. Chong, M. M. Lim, and N. Sultana, "Fabrication and Evaluation of Polycaprolactone / Gelatin-Based Electrospun Nanofibers with Antibacterial Properties," vol. 2015, 2015.
- [116] S. R. Gomes *et al.*, "In vitro and in vivo evaluation of electrospun nanofibers of PCL, chitosan and gelatin: A comparative study," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 46, pp. 348–358, 2015.
- [117] Y. C. Lim *et al.*, "Micropatterning and characterization of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofiber tissue scaffolds by femtosecond laser ablation for tissue engineering applications," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 1, pp. 116–126, 2011.
- [118] S. Pramanik, F. Ataollahi, B. Pinguan-Murphy, A. A. Oshkour, and N. A. A. Osman, "In Vitro Study of Surface Modified Poly(ethylene glycol)-Impregnated Sintered Bovine Bone Scaffolds on Human Fibroblast Cells," *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 9806, Sep. 2015.
- [119] M. E. Hoque *et al.*, "Processing of polycaprolactone and polycaprolactone-based copolymers into 3D scaffolds, and their cellular responses.," *Tissue Eng. Part A*, vol. 15, no. 10, pp. 3013–3024, 2009.
- [120] M. H. Huang *et al.*, "Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of ϵ -caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol)," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 69, no. 3, pp. 417–427, 2004.

- [121] R. Yao, J. He, G. Meng, B. Jiang, and F. Wu, "Electrospun PCL/Gelatin composite fibrous scaffolds: Mechanical properties and cellular responses," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 27, no. 9, pp. 824–838, 2016.
- [122] Z. X. Meng, Y. S. Wang, C. Ma, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, "Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 8, pp. 1204–1210, 2010.
- [123] M. P. Olmedilla, "Tissue engineering techniques to regenerate articular cartilage using polymeric scaffolds," Polytechnic University of Valencia, 2015.
- [124] C. Rufino de Sá e Silva, "Estudo da utilização do ácido hialurónico como veículo de entrega de células autólogas em substitutos de pele," Universidade Nova de Lisboa, 2016.