

Mónica Sofia Moreira da Silva Moreno

Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo



Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014



Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo

Mónica Sofia Moreira da Silva Moreno

Engenharia de Tecidos na substituição de tecido ósseo



Universidade Fernando Pessoa  
Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2014

---

(Mónica Sofia Moreira da Silva Moreno)

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## Resumo

Actualmente milhões de pessoas em todo o mundo são afectadas por problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações. Estes representam cerca de metade das doenças crónicas desenvolvidas em indivíduos com mais de 50 anos, conduzindo a problemas de dor prolongada e incapacidade física. A sua prevalência aumenta com a idade e estilo de vida, pelo que, com o aumento da população idosa, estes casos têm vindo a aumentar. A resolução destas situações normalmente exige cirurgias que envolvem a aplicação de, implantes ou enxertos ósseos. Apesar do êxito destas soluções terapêuticas, têm surgido alguns inconvenientes, relacionados com o facto de os implantes serem susceptíveis ao desenvolvimento de infecções e dos enxertos, poderem originar dores, infecções, morte dos tecidos do local dador e rejeições imunológicas.

Com a finalidade de colmatar estas limitações surgiu a Engenharia de Tecidos, que constitui uma área promissora na reparação e reconstrução de lesões ósseas, através do desenvolvimento de matrizes tridimensionais porosas, habitualmente designadas por *scaffolds*. Associadas a estas estruturas estão células osteoprogenitoras e factores de crescimento, que conduzem à formação de tecido ósseo novo, através da estimulação da capacidade natural de regeneração dos tecidos do paciente.

Neste trabalho de revisão bibliográfica é feita a compilação das metodologias e conceitos relacionados com a técnica da Engenharia de Tecidos na substituição de tecidos ósseos. A composição do tecido ósseo e os biomateriais utilizados em implantes ortopédicos são referidos. Os diferentes tipos de *scaffolds* e os seus diversos métodos de produção são descritos. Por fim, são abordadas várias técnicas (*in vitro* e *in vivo*) para a avaliação dos biomateriais de uso humano.

Palavras-chave: Tecido Ósseo; Enxertos; Implantes; Biomateriais; Engenharia de Tecidos; *Scaffolds*.

## **Abstract**

Currently million people worldwide are affected by inflammatory and degenerative problems of the bones and articulations. These conditions represent about a half of the chronic diseases developed in individuals over 50 years, leading to problems of prolonged pain and physical inability. Their prevalence rises with age and lifestyle. Therefore, with the growth of the elderly population that has been observed, these cases have been increasing. These situations usually require surgery, where bone grafts or implants are used. Nonetheless, despite the success of these therapeutic solutions, some drawbacks have been pointed out, which are related the risk of development of infections for implants. In contrast, for grafts, pains, infections, tissue death on the donor site and immunological rejections have been described.

To overcome these limitations the tissue engineering have been developed, which constitutes a promising area for repair and rebuild bone lesions, through the development of three-dimensional porous matrices, commonly known as scaffolds. Associated with these structures are the osteoprogenitor cells and growth factors, that lead to the formation of new bone by stimulating the natural regeneration ability of the patient's tissue.

In this review work is presented a compilation of the most important methodologies and concepts that are related to the technique of tissue engineering for the replacement of bone tissues. The composition of the bone tissue and the biomaterials more used in orthopedic implants are referred. Moreover, the different types of scaffolds and their different production methods are described. Finally, various *in vitro* and *in vivo* techniques for the evaluation of biomaterials for human use are discussed.

Key-words: Bone Tissue; Grafts; Implants; Biomaterials; Tissue Engineering; Scaffolds.

## **Agradecimentos**

Este espaço é dedicado à expressão do meu agradecimento a um conjunto de pessoas que tornaram possível a realização desta dissertação e conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Em primeiro lugar agradeço à Professora Doutora Ana Catarina Silva pela disponibilidade, dedicação e empenho fundamentais na organização e desenvolvimento deste trabalho.

Quero também agradecer, como não podia deixar de ser, à minha família, em especial aos meus pais, irmã e tia Margarida pela dedicação e acompanhamento ao longo do meu percurso académico.

E para terminar, também o meu agradecimento a todos os amigos que fiz ao longo do curso, com os quais vivenciei esta experiência e que juntos me ajudaram a ultrapassar esta etapa.

## Índice Geral

Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Agradecimentos.....	VII
Índice Geral.....	VIII
Índice de tabelas.....	IX
Índice de figuras.....	X
Lista de abreviaturas.....	XIII
1. Medicina Regenerativa <i>versus</i> Engenharia de Tecidos.....	1
2. Tecido ósseo.....	4
2.1. Composição e estrutura.....	4
2.2. Formação e regeneração.....	7
2.3. Problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações.....	8
3. Biomateriais.....	10
3.1.Implantes ortopédicos <i>versus</i> Enxertos ósseos.....	11
3.2. Biomateriais sintéticos.....	14
3.2.1. Metálicos.....	16
3.2.2. Cerâmicos.....	17
3.2.3. Poliméricos.....	18
3.2.4.Compósitos.....	22
3.3. <i>Scaffolds</i> .....	23
3.3.1. Tipos de <i>scaffolds</i> .....	24
3.3.2. Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> .....	25
3.3.2.1.Técnicas tradicionais para a produção de <i>scaffolds</i> porosos.....	26
3.3.2.2.Técnicas modernas para a produção de <i>scaffolds</i> porosos.....	30
3.3.2.3. Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> à base de hidrogeles.....	36
3.3.2.4. Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> fibrosos.....	39
3.3.2.5. Técnicas de produção de <i>scaffolds</i> à base de microesferas.....	43
3.3.2. Células, factores de crescimento e vascularização.....	44
3.4. Avaliação dos <i>scaffolds</i> .....	46
4. Conclusões.....	48
5. Referências bibliográficas.....	49

## Índice de tabelas

Tabela 1: Exemplos de polímeros naturais e sintéticos aplicados em Engenharia de Tecidos .....	20
Tabela 2: Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de <i>scaffolds</i> .....	25

## Índice de figuras

Figura 1: Ferramentas essenciais da engenharia de tecidos: cultivo de células em <i>scaffold</i> associado a factores de crescimento, na presença de nutrientes.....	2
Figura 2: Composição orgânica e inorgânica (mineral) do tecido ósseo.....	5
Figura 3: Diferenciação das células progenitoras dos osteoblastos com a intervenção e dos factores de crescimento.....	5
Figura 4: Estrutura do tecido ósseo.....	6
Figura 5: Prótese de substituição da anca.....	12
Figura 6: Utensílios de imobilização de fracturas – placa e parafusos de titânio.....	12
Figura 7: Evolução cronológica do desenvolvimento dos biomateriais utilizados na reparação e regeneração óssea.....	15
Figura 8: <i>Scaffold</i> metálico.....	17
Figura 9: <i>Scaffolds</i> de fosfato de cálcio.....	18
Figura 10: <i>Scaffolds</i> de colagénio.....	21
Figura 11: <i>Scaffold</i> poroso constituído por um material compósito (hidroxiapatite/ácido poli (lático-co-glicólico)).....	22
Figura 12: Exemplos das diferentes formas de <i>scaffolds</i> poliméricos em Engenharia de Tecidos .....	24
Figura 13: Técnica da formação de espumas gasosas.....	26
Figura 14: <i>Scaffold</i> obtido por formação de espumas gasosas.....	27

Figura 15: Esquema representativo da técnica de liofilização.....	27
Figura 16: <i>Scaffolds</i> preparados por liofilização.....	28
Figura 17: Representação da técnica evaporação de solvente/lixiviação de partículas...28	
Figura 18: <i>Scaffolds</i> obtidos pelo método de lixiviação de partículas.....	29
Figura 19: Método da separação de fase.....	29
Figura 20: <i>Scaffolds</i> preparados por separação de fase.....	30
Figura 21: Sistema usado na impressão a três dimensões .....	31
Figura 22: <i>Scaffolds</i> produzidos pela técnica de impressão a três dimensões.....	32
Figura 23: Funcionamento da técnica da modelagem por fusão e deposição.....	33
Figura 24: <i>Scaffold</i> sintetizado pela técnica da modelagem por fusão e deposição.....	33
Figura 25: Mecanismo da técnica de sinterização a laser.....	34
Figura 26: <i>Scaffolds</i> produzidos pelo método de sinterização a laser.....	34
Figura 27: Processos envolvidos na produção de estruturas por estereolitografia.....	35
Figura 28: Funcionamento de hidrogéis injectáveis como <i>scaffolds</i> .....	36
Figura 29: Técnicas usadas na produção de microgeles.....	38
Figura 30: Exemplos de microgeles com diferentes formas.....	39
Figura 31: Técnica de auto-montagem utilizando péptidos anfífilicos.....	40

Figura 32: <i>Scaffold</i> fibroso preparado pela técnica de auto-montagem.....	40
Figura 33: Esquema representativo da técnica de separação de fase.....	41
Figura 34: Rede de nanofibras obtida pela técnica de separação de fase.....	41
Figura 35: Funcionamento da técnica de electrofiação.....	42
Figura 36: <i>Scaffold</i> fibroso obtido por electrofiação.....	42
Figura 37: Distribuição de células tronco a partir de microesferas nanofibrosas.....	43
Figura 38: Biorreactores utilizados em Engenharia de Tecidos ósseos.....	44

### **Lista de abreviaturas**

CAD – Desenho assistido por computador

CAM – Manufactura assistida por computador

DNA – Ácido desoxirribonucleico

3 – DP – Impressão a três dimensões

EGC – Células germinativas embrionárias

ESC – Células tronco embrionárias

FDM – Modelagem por fusão e deposição

LSL – Litografia de varrimento a laser

MSCs – Células tronco mesênquimais

PCL – Poli-caprolactona

PGA – Poli (ácido glicólico)

PLA – Poli (ácido láctico)

PMMA – Polimetilmetacrilato

PPF – Poli (propileno fumaratos)

RNA – Ácido ribonucleico

SLS – Sinterização selectiva a laser

SLSS – Sinterização selectiva a laser de superfície

UHMWPE – Polietileno de ultra elevado peso molecular



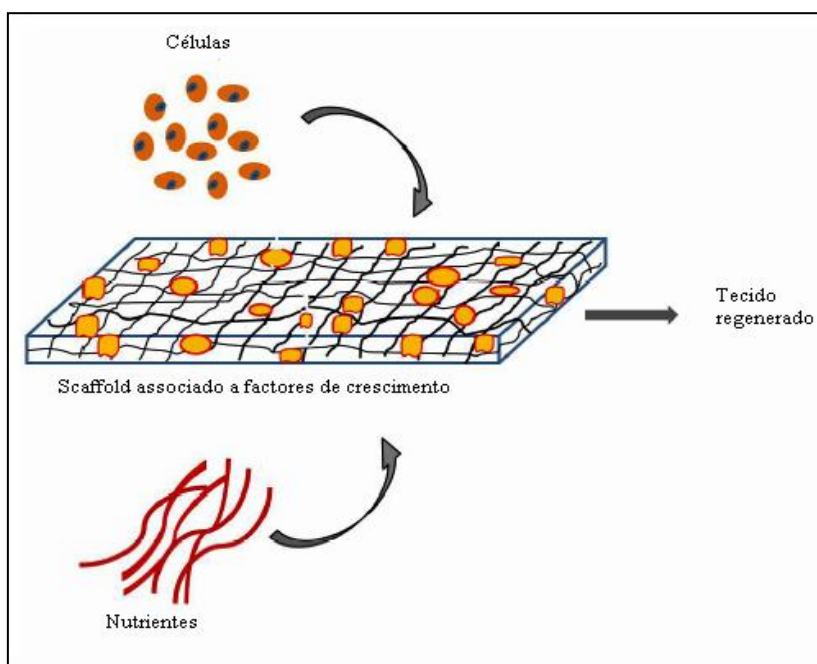
## 1. Medicina Regenerativa *versus* Engenharia de Tecidos

Nas últimas décadas do século XX a Biotecnologia sofreu uma colossal evolução, tanto ao nível da obtenção de novos conhecimentos, como também no aumento do número de processos biotecnológicos e do seu emprego na criação de materiais e dispositivos aplicados nas áreas da saúde e da prestação de serviços (Oliveira *et al.* 2010). Neste contexto surge a Medicina Regenerativa, na qual se insere a Engenharia de Tecidos.

A privação de um órgão ou de uma parte do corpo devido a anomalias congénitas, doenças graves (por ex. cancro) ou traumas origina, para além do desaparecimento da sua função fisiológica normal, perturbações psicológicas com repercussões sociais (Rodrigues, 2013).

Nestas situações, a terapia farmacológica convencional não é eficaz, sendo a solução de primeira escolha o recurso à engenharia biomédica, para efectuar transplantes de órgãos e tecidos artificiais, com o intuito de restabelecer os originais. Contudo, apesar dos progressos que têm sido efectuados, no sentido do melhoramento das características de biocompatibilidade e biofuncionalidade dos órgãos e tecidos artificiais, estes ainda não são considerados totalmente satisfatórios. Em alternativa, pode recorrer-se à transplantação de órgãos e tecidos a partir de dadores, embora estes existam em número escasso. Além disso, estes processos estão sempre associados a rejeições imunológicas, que implicam a necessidade de efectuar uma terapia imunossupressora concomitante (Ikada, 2006).

Com o objectivo de colmatar as falhas identificadas pelo uso das técnicas de engenharia biomédica e da falta de dadores, na sequência de uma reunião do comité da Fundação Nacional da Ciência dos Estados Unidos da América (EUA), surgiu um novo ramo da biotecnologia médica, a Engenharia de Tecidos. Esta técnica baseia-se em tirar partido da capacidade natural de regeneração dos tecidos e órgãos do próprio paciente, ultrapassando as limitações referidas acima (Ikada, 2006). Para o efeito são utilizadas como ferramentas essenciais as células, os *scaffolds* ou estruturas tridimensionais (3D) e os factores de crescimento (Figura 1).



**Figura 1:** Ferramentas essenciais da engenharia de tecidos: cultivo de células em *scaffold* associado a factores de crescimento, na presença de nutrientes (Adaptado de Sharma *et al.* 2014).

São as células que sintetizam a matriz do novo tecido, podendo ser classificadas de acordo com a sua origem, em autólogas (células do próprio paciente), alogénicas (células humanas de outro paciente) e xenogénicas (células de origem animal). Adicionalmente, as células podem também ser classificadas com base na disparidade do seu grau de diferenciação. Os *scaffolds* ou estruturas 3D são formados por matrizes porosas, que fornecem um suporte físico e ambiente apropriado para as células proliferarem e adquirirem uma conformação semelhante à que têm nos órgãos e tecidos do organismo. Os factores de crescimento compreendem uma diversidade de proteínas importantes na proliferação e diferenciação das células, auxiliando e impulsionando estas a regenerar o novo tecido (Ikada, 2006).

Com efeito, a Engenharia de Tecidos engloba a aplicação de conhecimentos das áreas da engenharia e das ciências da vida, como auxiliares da regeneração e restauração dos tecidos deformados ou lesados, gerando substitutos biológicos capazes de reparar, conservar ou aperfeiçoar o desempenho e actividade dos mesmos, aprimorando e desenvolvendo novas terapêuticas e fabricando novos biomateriais (Tabata, 2009).

Aproximadamente uma década depois do surgimento das técnicas de Engenharia de Tecidos, nasce a Medicina Regenerativa. Esta ciência surge após a comunicação do êxito do desenvolvimento das células estaminais embrionárias (*Embryonic Stem Cells*) e as células germinativas embrionárias (*Embryonic Germ Cells*) humanas, por dois grupos de investigação dos EUA (Thomson *et al.* 1998; Shambloott *et al.* 1998). As células estaminais possuem elevado potencial terapêutico, uma vez que possuem elevada taxa de crescimento e a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células presentes no organismo. Estas células são obtidas a partir de embriões recentemente formados (blastocistos), o que faz com que surjam limitações à sua aplicação, relacionadas com o surgimento de questões éticas, que emergem devido à necessidade de destruição dos embriões (Ikada, 2006).

A Medicina Regenerativa constitui uma área mais abrangente que a Engenharia de Tecidos, tendo como objectivo a substituição, reparação ou restauração das funções naturais de órgãos ou tecidos danificados, utilizando como terapêutica o recurso a células vivas (células estaminais embrionárias ou adultas), administradas isoladamente ou em associação com materiais biocompatíveis. Trata-se pois de um campo multidisciplinar que associa as áreas da terapia celular e da Engenharia de Tecidos (Langer e Vacanti, 1993; Polak, 2010).

## 2. Tecido ósseo

Com o objectivo de regenerar, reparar e impulsionar diferentes tecidos funcionais, através do fabrico de *scaffolds* ósseos, que devem ser representações convenientes do osso, a engenharia de tecidos ósseos (*bone tissue engineering*) tem de entender primeiramente a sua biologia e fisiologia, o que engloba a compreensão da sua estrutura, mecânica e formação (Polo-Corrales *et al.* 2014).

O osso humano é um tecido dinâmico e bastante vascularizado que cresce, renova-se e mantém-se activo durante toda a vida do organismo, sendo responsável por várias funcionalidades e capaz de responder a uma multiplicidade de estímulos (por ex. metabólicos, físicos e endócrinos) (Amini *et al.* 2012).

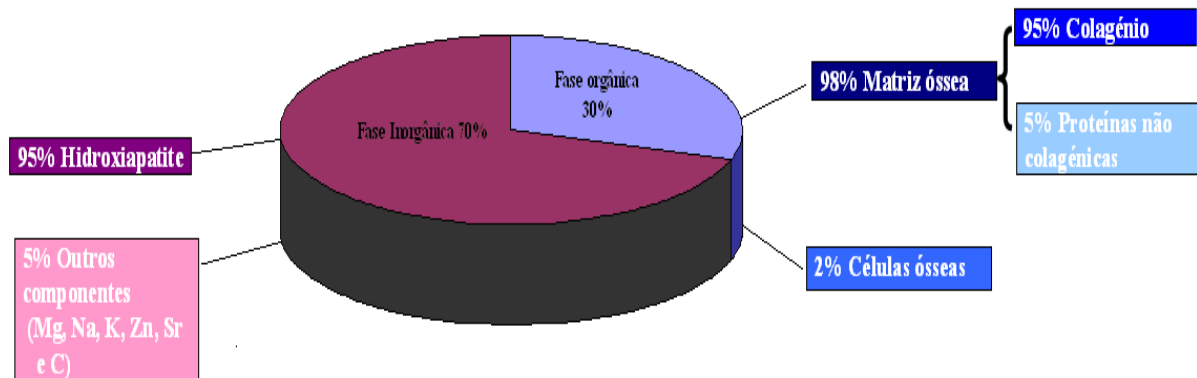
A dinâmica e constante reorganização do tecido ósseo é devida ao facto deste se encontrar num permanente ciclo de reabsorção e renovação. Neste ocorre uma sucessiva permuta química e remodelação estrutural devido ao seu reservatório de iões minerais, particularmente de cálcio e fósforo e células ósseas, que assumem várias formas e funções, conduzindo à constante formação, reabsorção, reparação e conservação da sua micro-arquitectura (Amini *et al.* 2012). Este procedimento garante a sustentação do esqueleto, pois elimina osso antigo substituindo-o por matriz nova (Tan *et al.* 2014).

Entre as actividades do tecido ósseo destacam-se (Stevens, 2008): a locomoção resultante da contracção muscular; a garantia da resistência de carga adequada; a sustentação do organismo na posição ortostática; a protecção dos órgãos internos; manutenção da homeostasia, através do armazenamento dos iões cálcio e fósforo, ajustando assim a concentração de electrólitos essenciais no sangue e a retenção dos elementos biológicos indispensáveis na hematopoiese. Com efeito, modificações na estrutura óssea, por lesão ou doença, podem interferir no equilíbrio corporal e consequentemente afectar a qualidade de vida dos indivíduos (Salgado *et al.* 2004).

### 2.1. Composição e estrutura

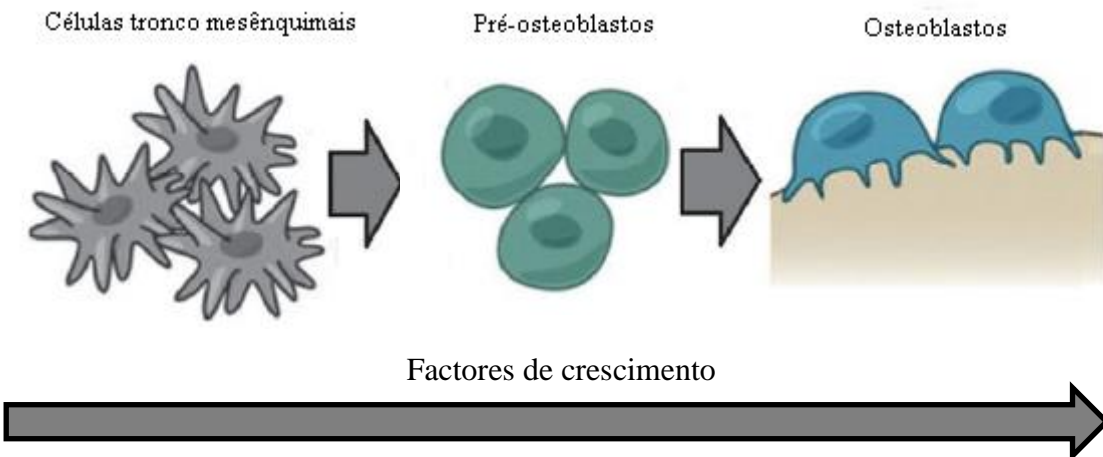
O tecido ósseo é composto por duas partes distintas da matriz extracelular óssea: uma orgânica não mineralizada formada essencialmente por fibras de colagénio tipo I, e uma

fase inorgânica mineralizada organizada principalmente por cristais de fosfato de cálcio, sob a forma de hidroxiapatite (Figura 2) (Amini *et al.* 2012).



**Figura 2:** Composição orgânica e inorgânica (mineral) do tecido ósseo (Adaptado de Alvarez e Nakajima, 2009).

A matriz extracelular óssea é gerada através da diferenciação dos osteoblastos (Figura 3), resultante da estimulação desencadeada pela acção dos factores de crescimento existentes no organismo (por ex. o factor de crescimento de fibroblastos) sobre as suas células progenitoras, os pré-osteoblastos provenientes de células tronco mesênquimais (*mesenchymal stem cells*) (Polo-Corrales *et al.* 2014).

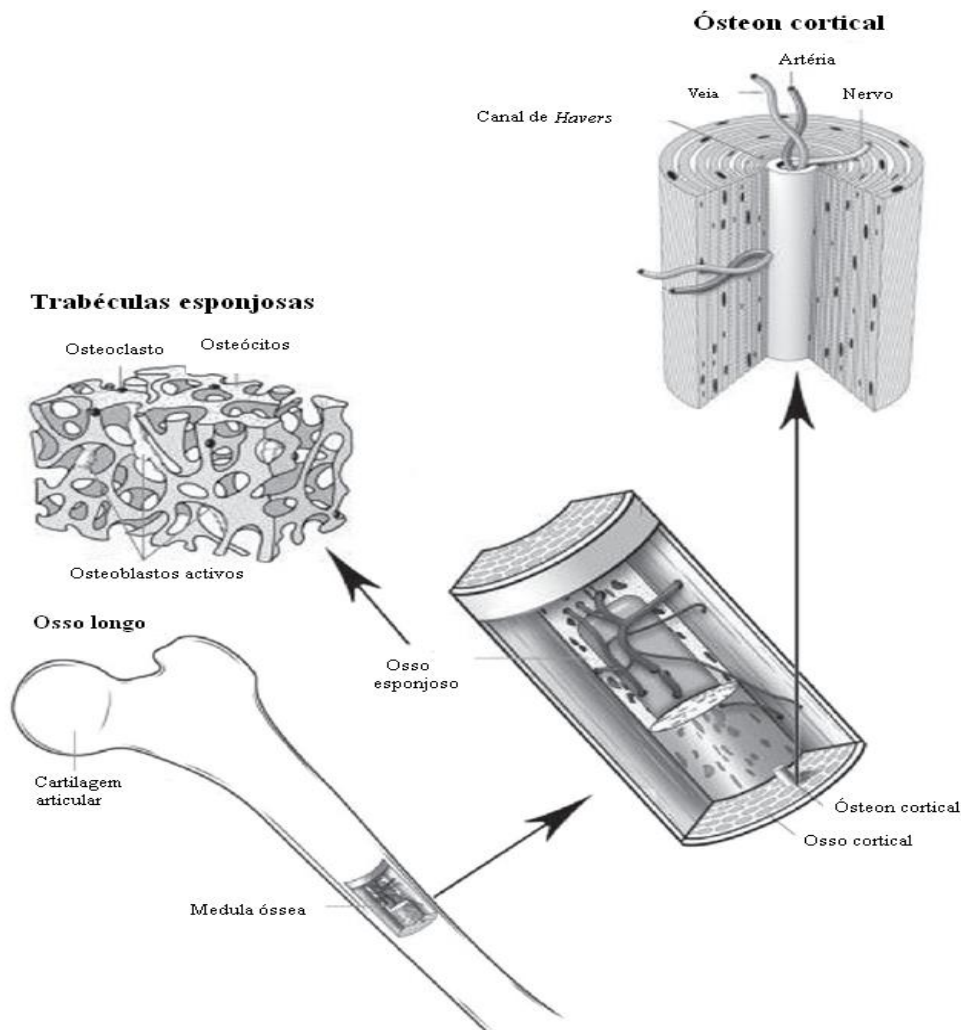


**Figura 3:** Diferenciação das células progenitoras dos osteoblastos com a intervenção dos factores de crescimento (Adaptado de Luu *et al.* 2009 ).

O processo de formação da matriz extracelular óssea ocorre em três etapas essenciais (Polo-Corrales *et al.* 2014): i) proliferação das células, ii) maturação da matriz, iii)

mineralização da matriz. Na primeira fase ocorre secreção de proteínas pelos osteoblastos, originando a componente não mineralizada da matriz extracelular óssea. No estágio seguinte sucede-se a reticulação das suas proteínas, promovendo uma estrutura mais compacta e estável. Por último ocorre a ligação das fibras de colagénio tipo I e a deposição dos minerais inorgânicos, originando a outra componente da matriz extracelular óssea.

O tecido ósseo, além de ser composto pela matriz extracelular óssea, também contém na sua composição tecido vivo (células), os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. A função dos primeiros está relacionada com a formação do osso novo, os osteócitos são as células mais abundantes do osso, tratando-se de células de revestimento e os osteoclastos intervêm na reabsorção do tecido ósseo antigo (Bose *et al.* 2013).



**Figura 4:** Estrutura do tecido ósseo (Adaptado de Buck e Dumanian, 2012).

Quanto à estrutura do tecido ósseo (Figura 4), são encontradas duas formas distintas, o osso esponjoso ou trabecular e o osso cortical ou compacto. O primeiro consiste na porção interior do osso de natureza porosa. Por outro lado, o cortical é bastante denso, correspondendo à sua camada exterior e possuindo menor porosidade (Bose *et al.* 2013).

O osso esponjoso é constituído por uma rede de trabéculas interligadas, que possuem no seu interior medula e proporcionam uma elevada área de superfície, que possibilita a difusão dos nutrientes e dos factores de crescimento, tornando-o metabolicamente mais activo que o osso cortical. Por este motivo, o osso esponjoso sofre renovação com mais frequência. Por outro lado, o osso cortical está organizado em vários ósteons, que se encontram condensados (unidade estrutural), formam lamelas concêntricas de matriz óssea concêntrica em torno de um canal central designado por canal de *Havers*. Com efeito, enquanto que as lamelas irregulares, designadas por trabéculas do osso esponjoso tornam possível a alteração da forma e assimilação do peso, o osso cortical é responsável pela atribuição de torção, compressão e resistência à flexão (Polo-Corrales *et al.* 2014).

## **2.2. Formação e regeneração**

Como referido anteriormente, o osso humano é conhecido pelas suas capacidades de crescimento, regeneração e remodelação. O seu processo de formação é efectuado por dois tipos de mecanismos, o intramembranoso e o endocondral. Ambos os métodos envolvem a actividade de células mesênquimais, sendo que no primeiro, estas diferenciam-se directamente em osteoblastos, enquanto no outro, se diferenciam em condrócitos, que depois de sofrer mineralização é substituído por osso (Amini *et al.* 2012).

A regeneração óssea constitui um processo fisiológico complexo que abrange diversos tipos de células e sinais moleculares, intra e extracelulares (Romagnoli *et al.* 2013). Este procedimento caracteriza-se por uma sequência de actividades celulares que se iniciam sempre com a formação de um hematoma e de uma resposta inflamatória, envolvendo aspectos característicos dos dois mecanismos de ossificação já mencionados. Com o estabelecimento da resposta inflamatória ocorre a libertação de citocinas e factores de

crescimento ósseo, conduzindo primeiramente à criação de osso intramembranoso, que resulta num tecido mole que estabiliza a lesão desenvolvida. De seguida, este sofre condrogénese que, origina tecido ósseo endocondral, tipicamente na forma trabecular, ocorrendo a posterior mineralização (Amini *et al.* 2012). A conclusão do processo ocorre quando parte deste osso trabecular formado se torna compacto e o seu excesso é reabsorvido pelos osteoclastos, desencadeando assim a remodelação do tecido ósseo (Guzmán *et al.* 2014).

### **2.3. Problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações**

Os problemas degenerativos e inflamatórios dos ossos e articulações afectam milhões de pessoas em todo o mundo, sendo responsáveis por cerca de metade das doenças crónicas em indivíduos com mais de 50 anos (Navarro *et al.* 2008). Entre estas destacam-se a Osteoartrite, Artrite reumatóide e Osteoporose, pois são as que mais comumente afectam a população mundial (Woolf e Pfleger, 2003).

A Osteoartrite é a doença degenerativa das articulações mais usual, que se caracteriza pela ocorrência de regiões de deterioração ou perda de cartilagem articular, sendo a osteoartrite do joelho a mais frequente (Musumeci *et al.* 2014).

As doenças inflamatórias crónicas em que se enquadram a artrite reumatóide e a osteoporose estão relacionadas com uma sucessiva perda de osso, devido a alterações no processo de remodelação óssea, nas quais ocorre aumento da reabsorção do osso e diminuição da sua formação (Hardy e Cooper, 2009). A artrite reumatóide é descrita pelo desgaste nas articulações e por privação de osso periarticular, aumentando significativamente a possibilidade de desenvolver osteoporose (Baarsen *et al.* 2009; Ringe e Sittinger, 2009). Esta última é caracterizada pela redução da densidade óssea, que conseqüentemente conduz a um maior enfraquecimento do osso e risco de ruptura. Devido ao acréscimo da população idosa é um dos mais frequentes e sérios problemas de saúde pública (Tan *et al.* 2014; Luu *et al.* 2009).

Como referido, a prevalência de desordens inflamatórias crónicas aumenta com o decorrer da idade. Por outro lado, o desenvolvimento de grande parte destas é afectado pelo estilo de vida dos indivíduos, como a obesidade e a falta de actividade física

(Woolf e Pflieger, 2003). Os problemas de saúde que advêm destas patologias na maior parte dos casos necessitam do recurso a cirurgias, para implantar dispositivos permanentes ou temporários, para a substituição de articulações ou solucionar fracturas ósseas (Navarro *et al.* 2008).

### 3. Biomateriais

Os seres humanos utilizam biomateriais desde a antiguidade, em que eram usados materiais naturais na tentativa de mudar a disposição dos tecidos lesados por alguma enfermidade. Ao longo dos tempos estes materiais foram sofrendo alterações, no sentido de melhorar e facilitar a sua acção, até que no século XX surgiram e começaram a ser empregues os polímeros sintéticos, os cerâmicos e as amálgamas de metais (Huebsch e Mooney, 2009).

Neste sentido, a definição de biomaterial surgiu em 1986, numa conferência sobre biomateriais: “ *um material não vivo usado em implantes ou dispositivos médicos, planeado para interagir com sistemas biológicos*” (Williams, 1987). Esta descrição trouxe alguma controvérsia por se restringir a materiais não vivos, pelo que em 1991, em outra conferência, este conceito foi redefinido como “*todo o material destinado a contactar com sistemas biológicos para avaliar, tratar, reforçar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo*” (William *et al.*1992).

Sendo assim, um biomaterial destinado a contactar com os tecidos deve obedecer a vários critérios, com o intuito de manter as suas características intrínsecas, tais como (Oliveira *et al.* 2010; Ratner, 2004; Tabata, 2009): biocompatibilidade para não desencadear reacções adversas no meio fisiológico; esterilidade para evitar o surgimento de infecções; osteocondutividade para promover a adesão celular e o crescimento ósseo; biodegradabilidade para uma fácil integração no organismo; propriedades mecânicas apropriadas à funcionalidade para que foram desenvolvidos; ausência de toxicidade; facilidade de manipulação; possibilidade de processamento em larga escala e densidade semelhante à dos meios biológicos.

A noção de substituição do osso envolve a troca da estrutura óssea através da sua reconstituição ou do preenchimento de uma perda de substância óssea. Esta mudança estrutural pretende possibilitar a migração, proliferação e diferenciação das células ósseas e impulsionar a vascularização, usufruindo da resposta natural do organismo face à lesão ou perda de tecido (Romagnoli e Brandi, 2014).

Na prática clínica são utilizadas técnicas de reconstrução cirúrgica e substituição, recorrendo a dispositivos mecânicos e à transplantação de vários tipos de tecidos. No caso da cirurgia de reconstrução, os dispositivos biomédicos usados podem não garantir

a total substituição das funcionalidades biológicas do órgão ou tecido em questão e, conseqüentemente, não conseguem prevenir a sua progressiva deterioração (Tabata, 2009). Deste modo a transplantação de órgãos e tecidos foi aumentando progressivamente, como sendo uma solução terapêutica eficaz. No entanto, as técnicas de transplantação apresentam algumas limitações, que se relacionam sobretudo com a ocorrência de rejeições e o risco de contrair doenças. As técnicas de Engenharia de Tecidos ósseos vieram ultrapassar estas restrições, constituindo uma alternativa promissora na substituição óssea, em casos de irregularidades ortopédicas, neoplasias ósseas, tratamento de artroses, estabilização de segmentos espinais e cirurgia ortopédica e reconstrutiva (Dimitriou *et al.* 2011). Os desenvolvimentos na área da Engenharia de Tecidos ósseos conduziram ao aparecimento de novos dispositivos funcionais, que envolvem a interação das células ósseas em matrizes porosas de materiais sintéticos ou naturais, com a finalidade de tentar reproduzir o microambiente do osso e facilitar a sua regeneração (Polo-Corrales *et al.* 2014).

### **3.1. Implantes ortopédicos versus Enxertos ósseos**

Os implantes e as próteses ortopédicos compõem um vasto ramo pertencente à indústria biomédica ao nível mundial. Tratam-se de dispositivos desenvolvidos para exercerem funções específicas após implantação no organismo, com o intuito de manter a estabilidade física e química e fornecer solidez mecânica, com o mínimo de toxicidade para o tecido receptor (Wang *et al.* 2011).

Normalmente os implantes e próteses são utilizados para a imobilização de fracturas de ossos longos, rectificação e estabilização de fracturas espinais e malformações, substituição de articulações e aplicações maxilofaciais, tornando mais fácil a recuperação das funcionalidades comprometidas e o alívio da dor. Um implante ortopédico geralmente é utilizado para adicionar volume ou alguma função a uma parte do organismo já existente, sendo de cariz definitivo enquanto uma prótese não é definitiva, sendo necessário o acompanhamento do doente, para a verificação da sua integração no organismo. Normalmente é usada para substituir um membro ou uma parte do organismo (Goodman *et al.* 2013).

Os dispositivos mais usados são próteses de substituição de articulações, como a da anca (Figura 5) e do joelho; instrumentos de fusão espinal e utensílios de imobilização

de fracturas, como os parafusos (Figura 6), as chapas e as varetas intramedulares (Wang *et al.* 2011).



**Figura 5:** Prótese de substituição da anca (Huebsch e Mooney, 2009).



**Figura 6:** Utensílios de imobilização de fracturas – placa e parafusos de titânio (Quiao *et al.* 2014).

Apesar das próteses e dos implantes serem mecânica e biologicamente adequados, estes podem desencadear infecções. Devido à colonização bacteriana e à geração de biofilmes (i.e. à adesão de microrganismos à sua superfície) sobre os dispositivos (Dunne *et al.* 2002; Goodman *et al.* 2013). Estas condições originam infecções agudas ou crónicas no osso subjacente, que podem alastrar aos tecidos moles circundantes, dificultando a recuperação do paciente (Goodman *et al.* 2013).

O problema da formação dos biofilmes sobre os implantes prende-se com o facto de estes protegerem os microrganismos da acção do sistema imunitário dos pacientes. Deste modo, estes são sujeitos a uma terapia com antibióticos, podendo o seu uso prolongado conduzir ao desenvolvimento resistências bacterianas e toxicidade local (Hetrick e Schoenfisch, 2006; van de Belt *et al.* 2001).

O surgimento das infecções ortopédicas associadas aos implantes implica a necessidade de efectuar uma cirurgia adicional para a remoção do dispositivo. Este facto tem levado ao desenvolvimento de técnicas para a sua prevenção e terapêutica, que passam pela utilização de um tipo de biomaterial mais adequado para formar o implante ou pela

produção de coberturas para protecção do dispositivo, resistentes às infecções e que não interfiram com a capacidade imunológica local do paciente e integração no tecido (Goodman *et al.* 2013).

Não obstante as suas vantagens na terapia, a actual estratégia terapêutica em vigor são os enxertos ósseos, em particular os autólogos, uma vez que estes possuem e conciliam os elementos e condições fundamentais para estimular o crescimento e regeneração de osso (Romagnoli e Brandi, 2014).

O poder de regeneração por parte destes enxertos é avaliado a partir de três mecanismos complementares, designados por osteoindução, osteocondução e osteogénese (Amini *et al.* 2012). O primeiro trata-se de uma característica inerente imprescindível à regeneração do tecido ósseo, pois estimula os factores de crescimento exógenos a promover a diferenciação das células que iniciam o seu processo de formação. A osteocondução fornece uma matriz de suporte e facilita a adesão das células ósseas e a osteogénese é o processo que induz a geração efectiva de tecido por parte das células ósseas (Polo-Corrales *et al.* 2014).

Os enxertos ósseos são usados para dilatar ou estimular a criação de osso novo no tratamento de fracturas esqueléticas, na substituição e regeneração em situações de perda de tecido ósseo. Entre estes destacam-se os enxertos autólogos e os enxertos alogénicos. Nos primeiros é transplantado tecido ósseo do próprio paciente (osso esponjoso, cortical ou vascularizado) normalmente da crista ilíaca para o local da lesão. Este tipo de transplantes apresenta inconvenientes como dor, infecções, cicatrização e hemorragia, pois a extracção de tecido é traumática, causando a morte dos tecidos do local dador. Por outro lado, os enxertos alogénicos envolvem a transferência de tecido entre dois indivíduos da mesma espécie (cadáveres ou doadores vivos). A sua vantagem em relação aos anteriores é a maior disponibilidade, o que evita a necessidade de uma nova cirurgia para a extracção de osso. No entanto, estes não possuem a capacidade osteogénica dos anteriores, uma vez que não contêm elementos celulares, devido aos processos de tratamento a que são sujeitos, têm reduzida capacidade osteoindutiva, podem conduzir a infecções e, sobretudo, a rejeições imunológicas (Roberts e Rosenbaum, 2012).

Desta forma, as limitações da utilização têm estimulado a investigação no sentido da procura de alternativas, tanto no que diz respeito à utilização de novos biomateriais biologicamente funcionais como de terapias clínicas promissoras (Dimitriou *et al.* 2011).

### **3.2. Biomateriais sintéticos**

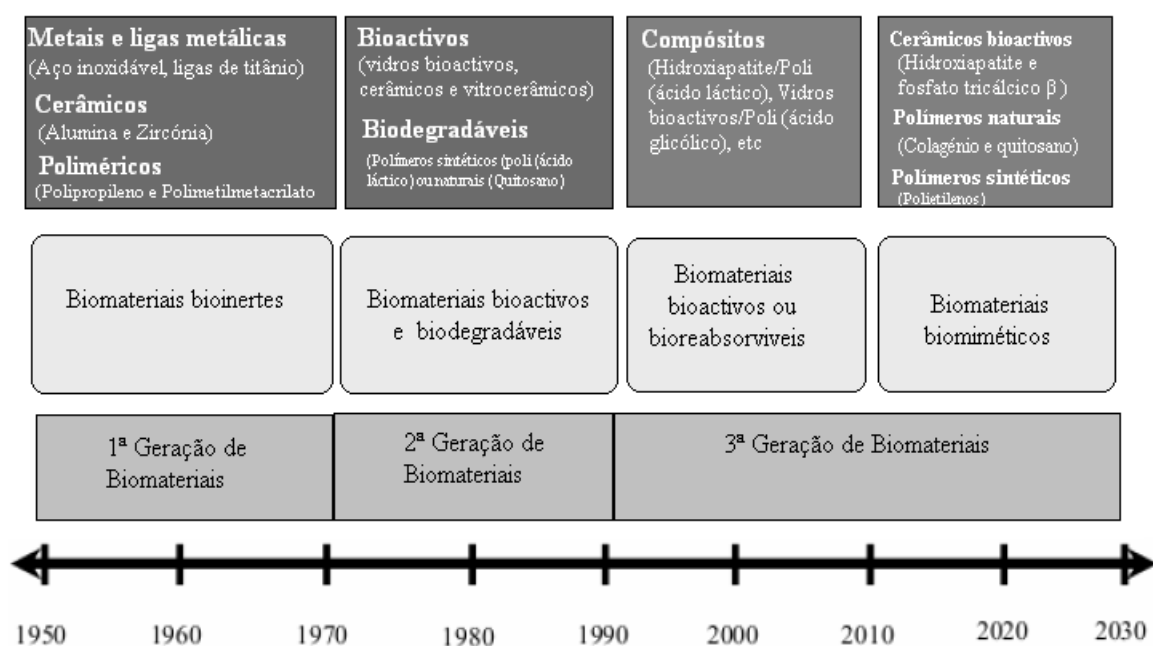
O crescimento e progresso das investigações acerca dos biomateriais deu-se de acordo com os avanços nos conhecimentos adquiridos acerca do microambiente do local das lesões. Consequentemente, as alterações nos requisitos e características pretendidas para um determinado material, conduziram à criação de três gerações de biomateriais (Figura 7). A primeira geração é composta por materiais bioinertes, a segunda engloba materiais bioactivos e biodegradáveis e a terceira, projectada para impulsionar respostas celulares específicas ao nível molecular, por conciliar a bioactividade e biodegradabilidade da geração anterior (Hench e Polak, 2002).

A primeira geração de biomateriais surgiu entre os anos 60 e 70, com a finalidade de serem utilizados em implantes médicos (Hench, 1980). Com o aparecimento destes materiais aspirava-se obter propriedades (físicas e mecânicas) semelhantes às do tecido lesado, sem interagirem com a biologia do organismo hospedeiro, ou seja, sendo bioinertes. Como exemplos de materiais pertencentes a esta geração temos os metálicos (por ex. aço inoxidável e titânio), cerâmicos (por ex. alumina e zircónia) e poliméricos (por ex. polipropileno e polimetilmetacrilato) (Polo-Corrales *et al.* 2014). No entanto, estes materiais desencadeiam a formação de uma camada de tecido fibroso à sua volta, que dificulta a adesão do implante ao tecido receptor, podendo originar o seu desprendimento (Anderson, 2001; Hench e Thompson, 2010).

Em 1984 emergiu um novo grupo de materiais, concebidos a partir da modificação dos anteriores, através da incorporação de coberturas bioactivas ou biodegradáveis. Com o uso das primeiras pretendia-se melhorar a resposta bioinerte dos materiais antecessores e obter uma acção biológica específica (osteocondução), para impedir a formação da camada de tecido fibroso, melhorando a sua adesão ao tecido receptor (osteointegração). Por outro lado, com os biodegradáveis o objectivo é que estes sofram uma progressiva degradação ou solubilização, enquanto ocorre regeneração dos tecidos (Hench e Wilson,

1984; Navarro *et al.* 2008; Tabata, 2009). Com efeito, esta geração abrange dois tipos de materiais, os bioativos e os biodegradáveis. Nos primeiros enquadram-se os vidros bioativos, cerâmicos, vitro-cerâmicos e compósitos. Os segundos englobam os polímeros sintéticos (poli ( $\epsilon$ -caprolactona), poli (ácido láctico)) ou naturais (quitosano, ácido hialurónico) (Navarro *et al.* 2008; Polo-Corrales *et al.* 2014).

Por fim, a terceira geração de biomateriais surgiu através da conjugação das propriedades de bioatividade e biodegradabilidade, que marcaram a geração anterior, com a capacidade de estimulação para actividades e procedimentos celulares específicos (Hench e Polak, 2002). Foi também nesta geração que teve início o desenvolvimento de matrizes porosas constituídas por materiais biomiméticos. Estes últimos estão relacionados com a emergência da Engenharia de Tecidos, que tem como objectivo obter materiais com características mecânicas apropriadas para o tecido em questão e propriedades semelhantes às da matriz extracelular óssea nativa do paciente (Navarro *et al.* 2008).



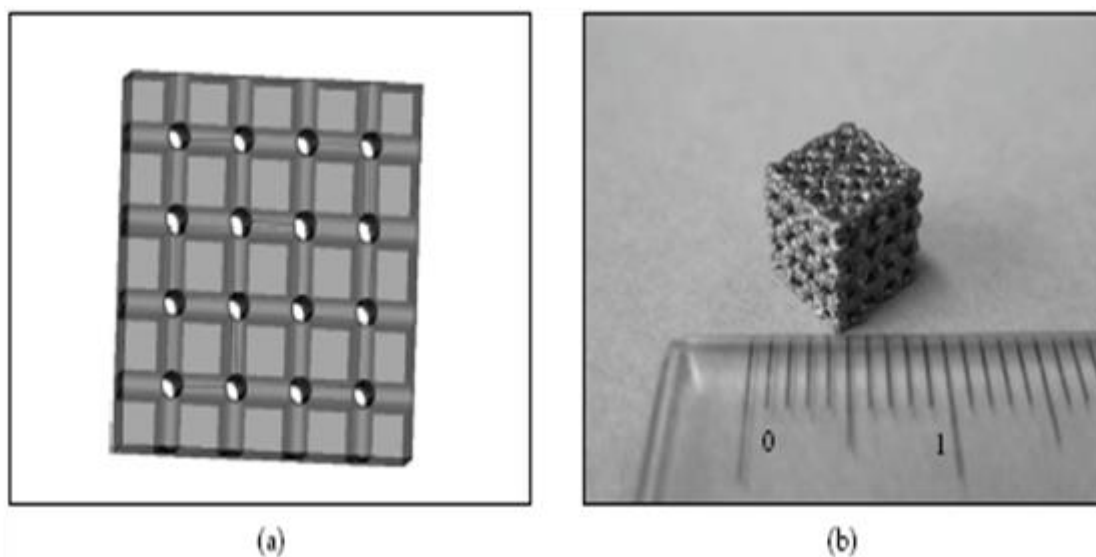
**Figura 7:** Evolução cronológica do desenvolvimento dos biomateriais utilizados na reparação e regeneração óssea (Adaptado de Murugan e Ramakrishna, 2005).

### 3.2.1. Metálicos

Os metais são materiais com diversas aplicações em Ortopedia, tais como (Matassi *et al.* 2013; Navarro *et al.* 2008): o suporte de carga em dispositivos de fixação de fracturas e de substituição de articulações; força, flexibilidade, dureza, aderência à fractura e ductilidade, devido às suas propriedades mecânicas; biocompatibilidade; resistência à corrosão.

No entanto, o uso de biomateriais metálicos apresenta alguns inconvenientes, tais como (Alvarez e Nakajima, 2009; Matassi *et al.* 2013): a possível libertação de espécies iónicas tóxicas resultantes do desgaste, corrosão ou dissolução sofridos após fricção e interacção com o tecido adjacente, podendo provocar inflamação e reacções alérgicas, que diminuem a biocompatibilidade e ocasionam a perda de tecido; a atenuada estimulação ao desenvolvimento de osso novo; o desaparecimento do vigor mecânico no local do implante, conduzindo à reabsorção óssea que determina a sua perda. Uma das formas de minimizar estas limitações é transformar estes materiais bioinertes em bioactivos, de modo a permitir uma melhor interacção com o organismo e impulsionar a adesão celular, através do revestimento superficial do dispositivo com materiais bioactivos ou da sua modificação química (Navarro *et al.* 2008).

Entre os materiais metálicos mais utilizados destacam-se o aço inoxidável, as ligas metálicas de cobalto-crómio e de titânio e o tântalo. Além das aplicações mencionadas anteriormente estes materiais também podem ser utilizados na produção de estruturas porosas no âmbito da engenharia de tecidos ósseos (por ex. uso de *scaffolds* à base de titânio e tântalo – Figura 8), apesar do seu comportamento *in vitro* e *in vivo* ainda ser pouco conhecido (Banhart, 2001, Matassi *et al.* 2013; Wu *et al.* 2008).



**Figura 8:** *Scaffold* metálico – (a) modelo de *scaffold* obtido pelo *software* de desenho assistido por computador (b) *scaffold* de titânio (Peppo *et al.* 2012).

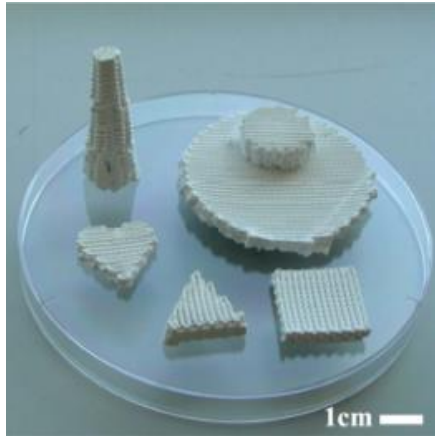
### 3.2.2. Cerâmicos

Estes materiais são usados em várias aplicações dentro da ortopedia, que vão desde a reconstrução, substituição e reparação de tecidos lesados à elaboração de *scaffolds* porosos de aplicação na área da engenharia de tecidos ósseos (Bose *et al.* 2013; Hench, 1991; Romagnoli *et al.* 2013).

Dentro deste grupo de materiais encontram-se dois tipos de cerâmicos (Bose *et al.* 2013; Navarro *et al.* 2008): i) os bioinertes (por ex. alumina e zircônia), usados na constituição de próteses articulares, por não sofrerem oxidação e corrosão em meio biológico e apresentarem elevada dureza, reduzindo a fricção e o desgaste; ii) os bioativos (por ex. hidroxiapatite, fosfato tricálcico  $\beta$ , vidros bioativos e vitro-cerâmicos), utilizados no preenchimento de perdas de substância óssea, revestimento de implantes metálicos articulares e dispositivos para fixação óssea, por serem frágeis e possuírem uma fraca resistência mecânica e também na produção de *scaffolds*.

Uma vez que o osso é maioritariamente constituído por hidroxiapatite, têm sido investigados biomateriais que contenham na sua composição análogos ou indutores químicos deste composto, com o intuito de tornar mais rápida a regeneração óssea (Bose *et al.* 2012). Desta forma, numerosos *scaffolds* (Figura 9) à base deste composto

ou outros derivados de fosfato de cálcio têm sido construídos na medida em que manifestam osteocondutividade, bioatividade e reabsorção *in vivo*. No entanto, estes apresentam inconvenientes, como a sua estrutura quebradiça e a fraca estabilidade mecânica, que limita a sua utilização em situações de grandes irregularidades ósseas (Rezwan *et al.* 2006; Salgado *et al.* 2004).



**Figura 9:** *Scaffolds* de fosfato de cálcio (Yun *et al.* 2014).

Além dos *scaffolds* à base de materiais cerâmicos sintéticos, estes também podem ser construídos à base de materiais cerâmicos de origem natural, como o coral, que revela uma arquitectura porosa análoga à do osso trabecular, além da sua natureza orgânica reduzir o risco de toxicidade e de reacções inflamatórias (Guillemin *et al.* 1989; Hannouche *et al.* 2001).

### 3.2.3. Poliméricos

Os polímeros podem ser de origem natural ou sintética. Os naturais subdivide-se em três classes, proteínas (por ex. colagénio, gelatina, fibrinogénio, elastina, actina, queratina, miosina e proteínas da seda), polissacarídeos (por ex. celulose, amilose, dextrano, quitina e glucosaminoglicanos) e polinucleótidos (por ex. ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA) e o ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*, RNA). Entre os polímeros sintéticos destacam-se os polietilenos, o polimetilmetacrilato (*Polymethylmethacrylate*, PMMA), os poli ( $\alpha$ -hidroxiácidos) ou poliésteres ((poli (ácido láctico) (*Polylactic Acid*, PLA) e poli (ácido glicólico) (*Polyglycolic Acid*, PGA)), a policaprolactona (*Poly ( $\epsilon$ -Caprolactone*, PCL)) e os poli (propileno fumaratos) (*Propylene Fumarate*, PPF) (Navarro *et al.* 2008; Yannas, 2004).

Os compostos de origem natural normalmente são empregues na área da engenharia de tecidos na construção de *scaffolds* aplicáveis a vários tecidos (por ex. osso, cartilagem, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais), devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioactividade, com o intuito de suportarem o crescimento e proliferação celular. No entanto, a sua utilização apresenta desvantagens, como reduzida força mecânica, rejeições imunológicas devido a materiais derivados de fontes animais e a possibilidade de conterem impurezas patogénicas.

Dos constituintes naturais acima referidos têm especial importância o colagénio (Figura 10), por se tratar de um dos componentes principais do tecido ósseo e o quitosano, que também possui propriedades antibacterianas, curativas e bioadesivas, podendo os *scaffolds* criados à base deste composto ser utilizados na fixação de péptidos que cooperam na formação do osso (Aravamudhan *et al.* 2013; Costa-Pinto *et al.* 2011).

Relativamente aos polímeros sintéticos, os dois primeiros compostos (polietilenos e PMMA) pertencem à primeira geração de biomateriais e são dos constituintes mais utilizados em Ortopedia. Os polietilenos, polietileno de ultra-elevado peso molecular (*Ultrahigh Molecular Weight Polyethylene*, UHMWPE) ou os polietilenos altamente reticulados (*cross-linking* UHMWPE) são principalmente utilizados na composição de dispositivos articulares, particularmente destinados à anca e joelho. Apesar da elevada resistência ao choque, da biocompatibilidade e estabilidade química, o UHMWPE quando em atrito com os diferentes biomateriais que compõem as próteses, sofre um desgaste que resulta na libertação de partículas que podem originar reacções de intolerância local e o conseqüente insucesso do implante. De forma a tentar colmatar ou atenuar este processo surgiram os polietilenos altamente reticulados, em que a reticulação reduz certas propriedades mecânicas deste material, como a sua resistência à fadiga. Quanto ao PMMA, a sua utilização baseia-se na fixação de próteses de substituição articular e preenchimento de perdas de substância óssea. A sua aplicação apresenta alguns inconvenientes, tais como o efeito exotérmico no momento da sua colocação, que pode resultar na necrose do tecido circundante; contracção durante a polimerização, conduzindo a fissuras, provocando a perda de ligação entre si e o dispositivo; oscilações na sua rigidez, que podem originar a sua quebra e subsequente libertação de partículas, que ao interagirem com os tecidos induzem uma resposta inflamatória (Mano *et al.* 2004; Navarro *et al.* 2008).

Em relação aos restantes materiais poliméricos, estes já integram a segunda e terceira gerações de biomateriais e, apesar de possuírem também aplicações no âmbito da cirurgia ortopédica, são maioritariamente usados na área da engenharia de tecidos na preparação de *scaffolds*. Esta utilização deve-se ao facto de existir um maior controlo das suas propriedades físico-químicas, comparativamente à dos polímeros de origem natural, melhores e reprodutíveis características mecânicas e de degradação (Dhandayuthapani *et al.* 2011; Navarro *et al.* 2008; Slaughter *et al.* 2009).

Os polímeros são também usados na formação de hidrogéis, que possuem a capacidade de retenção de elevadas quantidades de água de forma a reproduzir o ambiente da matriz extracelular de tecidos moles e fornecer os agentes bioactivos necessários à estimulação da regeneração de tecidos. Contudo, estes sistemas apresentam baixa força mecânica, o que dificulta o seu manuseamento (Kirschner e Anseth, 2013; Lee e Mooney, 2001; Liu e Ma, 2004; Navarro *et al.* 2008; Vagaská *et al.* 2010).

**Tabela 1:** Exemplos de polímeros naturais e sintéticos aplicados em engenharia de tecidos (Adaptado de Salgado *et al.* 2004).

Material	Origem	Características
<b>Colagénio</b>	Natural	-Baixo potencial imunogénico, quimiostático e bom substrato para adesão celular - <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas
<b>Fibrina</b>	Natural	-Promove migração celular e vascularização
<b>Quitosano</b>	Natural	-Hemostático e promove osteocondução e cura das lesões
<b>Amido</b>	Natural	- Comportamento termoplástico, bom substrato para adesão celular, não citotóxico e biocompatível - Ligação ao osso quando reforçado com hidroxiapatite - <i>Scaffolds</i> com boas propriedades mecânicas
<b>Ácido hialurónico</b>	Natural	- Mínima imunogenicidade

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Quimiostático quando combinado com agentes apropriados</li> <li>- <i>Scaffolds</i> com baixas propriedades mecânicas</li> </ul>
<b>Poli (hidroxibutirato)</b>	Natural	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Substrato adequado para crescimento ósseo mas possui uso limitado devido à sua natureza quebradiça</li> </ul>
<b>Poli (<math>\alpha</math>-hidroxiácidos)</b>	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poliésteres alifáticos extensivamente estudados, degradados por hidrólise, podem apresentar problemas relativamente à biocompatibilidade e citotoxicidade na área circundante ao local da implantação</li> </ul>
<b>Poli (<math>\epsilon</math>-caprolactona)</b>	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poliéster alifático</li> <li>- Degradado por hidrólise ou erosão</li> <li>- Baixa versatilidade química</li> <li>- Alguns problemas relacionados com a resistência mecânica a cargas</li> </ul>
<b>Poli (propileno fumaratos)</b>	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Poliésteres insaturados alternados de propilenoglicol e ácidos fumáricos</li> <li>- Resultados biológicos satisfatórios</li> </ul>
<b>Poli (fosfazenos)</b>	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Degradação através de hidrólise</li> </ul>
<b>Poli (anidridos)</b>	Sintética	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Principalmente desenvolvido para distribuição de fármacos, é biocompatível e suporta regeneração óssea endosteal e cortical</li> </ul>

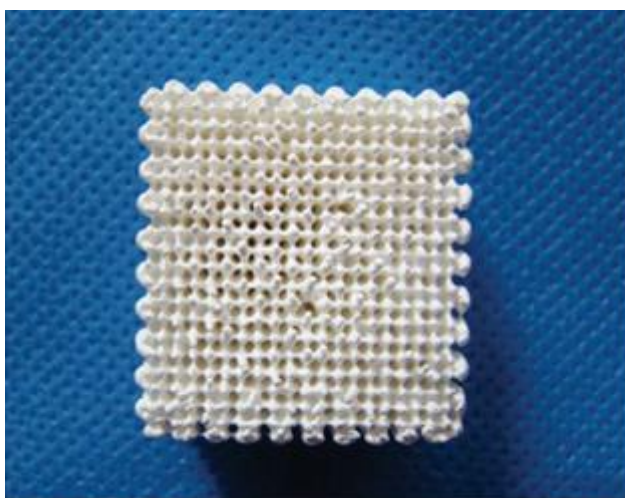


**Figura 10:** *Scaffolds* de colagénio (Kanayama *et al.* 2014).

### 3.2.4. Compósitos

Um material compósito é constituído por pelo menos duas fases, uma contínua e outra dispersa. A primeira é a fase aglomerante, que se encarrega da ocupação do volume e da transposição de carga para a fase dispersa, que é mais rígida e resistente, tendo a função de melhorar algumas das propriedades do compósito (Mano *et al.* 2004).

Estes compostos surgiram com o intuito de superar as limitações dos biomateriais, usando-se uma combinação de diferentes tipos de biomateriais, de forma a obter as vantagens inerentes de cada um, através de um efeito sinérgico. Deste modo, as propriedades dos compósitos são únicas e diferentes das dos materiais em separado. As suas aplicações passam pela construção de *scaffolds* alusivos à engenharia de tecidos ósseos (Figura 11), uma vez que o próprio tecido ósseo é considerado um compósito natural, pois é constituído pela mistura de cristais inorgânicos de hidroxiapatite e fibras orgânicas de colagénio (Chen *et al.* 2012; Porter *et al.* 2009; Vagaská *et al.* 2010). Estes *scaffolds* são construídos a partir de diferentes matrizes, como por exemplo, a conjugação de polímeros com biomateriais cerâmicos, biomateriais cerâmicos associados a metálicos ou a mistura de polímeros com metais (Mano *et al.* 2004). Destas junções destacam-se os compósitos de polímeros e cerâmicos, pois aliam a tenacidade dos polímeros com a força de compressão dos cerâmicos, semelhante à do tecido ósseo. Obtêm-se assim *scaffolds* bioactivos com notáveis características mecânicas e boas taxas de degradação (Porter *et al.* 2009; Stevens, 2008).



**Figura 11:** *Scaffold* poroso constituído por um material compósito (hidroxiapatite/ácido poli (lático-co-glicólico)) (Chen *et al.* 2013).

### 3.3. *Scaffolds*

Como já referido, a engenharia de tecidos ósseos tem vindo a desenvolver uma alternativa promissora para a reparação de lesões ósseas, designada por *scaffolds* no sentido de colmatar as limitações da terapêutica em curso (Dimitriou *et al.* 2011; Ikada, 2006).

O uso dos *scaffolds* prende-se com o facto do osso ser um tecido tridimensional activo mas quando isoladas *in vitro*, as suas células não adquirem essas conformações em 3D. Assim os *scaffolds* proporcionam um ambiente adequado para a suas células se agregarem, proliferarem, diferenciarem e permitirem a deposição da nova matriz extracelular óssea (Costa-Pinto *et al.* 2011). Estas estruturas são constituídas pelos diferentes biomateriais, sendo que para conseguir alcançar a regeneração óssea deverão possuir algumas características físicas e biológicas fundamentais, tais como:

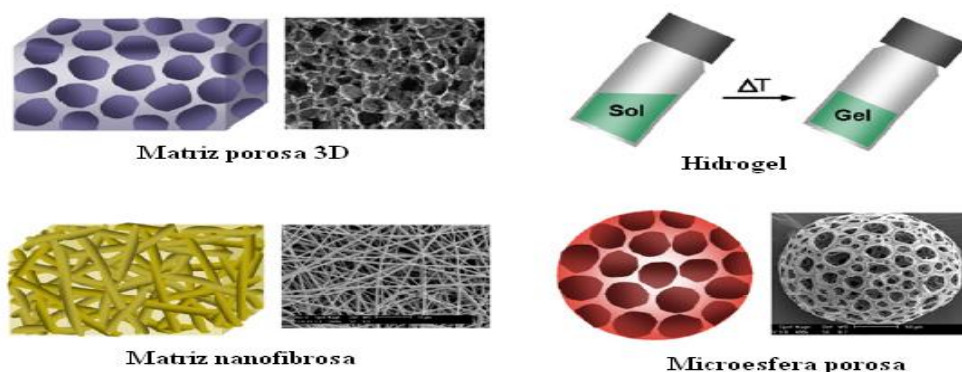
- Biocompatibilidade, que se traduz na capacidade do biomaterial e dos seus produtos de degradação não provocarem uma resposta inflamatória no paciente nem demonstrarem imunogenicidade ou citotoxicidade (Williams, 2008).
- Biodegradabilidade controlada e ajustada de forma a garantir o suporte estrutural necessário para a regeneração completa do tecido em questão (Costa-Pinto *et al.* 2011).
- Estrutura porosa interligada e arquitectada através da associação de macro e microporos, que facilita o crescimento do tecido, a vascularização, melhora o transporte de nutrientes e oxigénio e a remoção de resíduos. Contudo, uma elevada porosidade reduz significativamente as propriedades mecânicas do *scaffold*, pondo em causa a sua integridade estrutural (Bose *et al.* 2012; Liu e Ma; 2004; Navarro *et al.* 2008). Outro factor importante são as dimensões do poro, que estão directamente relacionadas com a vascularização, uma vez que poros de tamanho maior depressa se vascularizam, estimulando directamente a osteogénese. Por outro lado, os poros mais pequenos têm mais dificuldades de vascularização, resultando em situações de hipoxia, que conduzem a um processo osteocondral antes da osteogénese ocorrer. O tamanho mínimo aceite é 100-150 $\mu$  (Costa-Pinto *et al.* 2011; Ikada, 2006).

- Propriedades mecânicas que garantam o suporte estrutural durante o manuseamento e as actividades normais do paciente (Chen *et al.* 2012). As características mecânicas devem ser semelhantes às do tecido nativo destacando-se a rigidez, a força e resistência às tensões sofridas *in vivo* até que o novo tecido formado ocupe a matriz do *scaffold* (Alvarez e Nakajima, 2009).
- Osteocondutividade e osteoindução que permitirão ao *scaffold* a adesão e proliferação das células ósseas e a geração da matriz extracelular óssea na sua superfície porosa (Bose *et al.* 2012).
- Estrutura anisotrópica que lhe possibilita adaptar-se às formas anatomicamente exactas (Romagnoli e Brandi, 2014).

### 3.3.1. Tipos de *scaffolds*

Entre as classes de biomateriais referidas anteriormente, os polímeros naturais e sintéticos são os mais utilizados na preparação destas matrizes em estruturas 3D.

Existem diferentes formas de matrizes (Figura 12), destacando-se os típicos *scaffolds* porosos na forma de espuma sólida, os hidrogéis, os *scaffolds* fibrosos à base de nanofibras e os *scaffolds* constituídos por microesferas (Dhandayuthapani *et al.* 2011).



**Figura 12:** Exemplos das diferentes formas de *scaffolds* poliméricos em engenharia de tecidos (Chung e Park, 2007).

### 3.3.2. Técnicas de produção de *scaffolds*

As diferentes técnicas de preparação de *scaffolds* conferem-lhes diferentes propriedades estruturais, pelo que a escolha do método de produção terá de entrar em linha de conta com os requisitos necessários e a finalidade da sua aplicação (Yang *et al.* 2001).

As estruturas porosas em 3D são fundamentais em engenharia de tecidos pois proporcionam um suporte capaz de comportar células reparadoras e factores de crescimento ambos essenciais à recuperação de tecidos lesados (Alvarez e Nakajima, 2009).

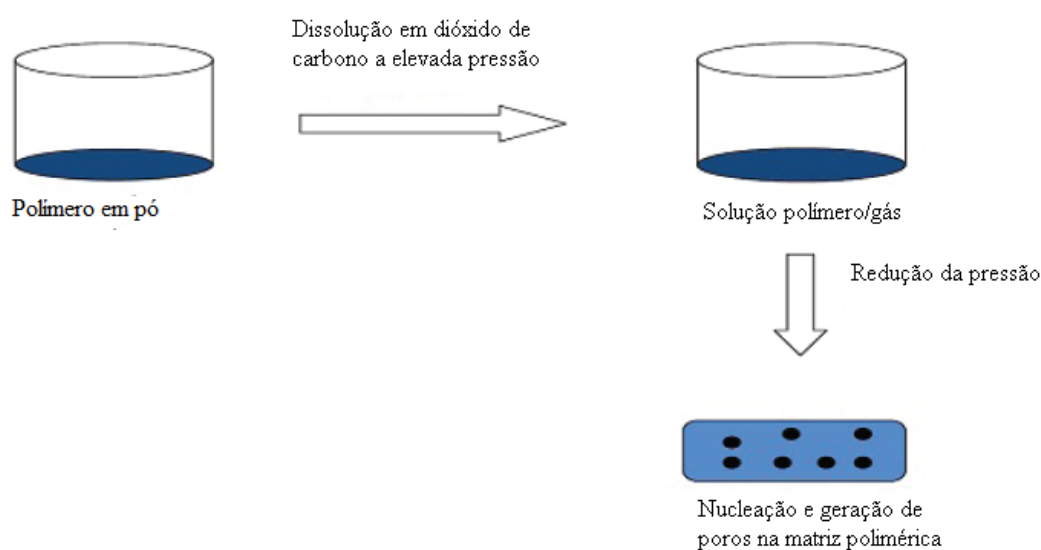
A Tabela 2 resume as vantagens e desvantagens resultantes da aplicação das diversas técnicas usadas na produção dos diferentes tipos de *scaffolds*.

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens dos diferentes tipos de *scaffolds* (Adaptado de Musumeci *et al.* 2014).

<i>Scaffolds</i>	Vantagens	Desvantagens
<b>Porosos pelas técnicas tradicionais</b>	Elevada porosidade, estrutura interligada e simples e fáceis de produzir	Uso de solventes altamente tóxicos, baixa interligação dos poros, dificuldade em cultivar células homoganeamente após produção e possibilidade de manifestarem fracas propriedades mecânicas
<b>Porosos pelas técnicas modernas</b>	Arquitectura da matriz controlada: tamanho, forma, interligação, geometria e orientação, controlo dos poros e das suas dimensões e propriedades mecânicas e degradação controladas	Uso restrito a materiais poliméricos seleccionados
<b>Hidrogeles</b>	Flexibilidade e viscoelasticidade	Hidrogeles de polímeros naturais podem induzir respostas inflamatórias e baixa resolução
<b>Fibrosos</b>	Fáceis de produzir, elevada área de superfície e elevada distância entre as fibras para a nutrição e troca de oxigénio	Fraca integridade mecânica e poros pequenos que limitam a infiltração das células e a sua integração com o tecido receptor após implantação
<b>Microesferas</b>	Arquitectura e variações composicionais reprodutíveis	Difíceis de remover uma vez injectadas ou implantadas

### 3.3.2.1. Técnicas tradicionais para a produção de *scaffolds* porosos

Na elaboração de *scaffolds* porosos as primeiras técnicas foram a formação de espumas gasosas ou químicas (Figuras 13 e 14), a liofilização, a evaporação de solvente/lixiviação de partículas e a separação de fase (Amini *et al.* 2012; Liu e Ma, 2004). A primeira técnica permite produzir espumas de polímeros bastante porosos sem recorrer a solventes orgânicos. O processo envolve a saturação de dióxido de carbono ou azoto em discos de polímeros produzidos num molde a elevadas temperaturas. Estes discos são sujeitos a elevadas pressões destes gases numa câmara durante alguns dias que, com o passar do tempo, são reduzidas até à pressão atmosférica. Após a sua libertação cria-se uma instabilidade termodinâmica que origina a nucleação e a geração de macroporos. Esta técnica apresenta como desvantagens a baixa interligação entre os poros, o facto de os poros serem fechados e reduzidas propriedades mecânicas. Uma forma de melhorar a ligação dos poros é a conjugação deste método com a técnica de lixiviação de partículas descrita mais à frente (Harris *et al.* 1998; Liu e Ma, 2004; Mikos e Temenoff, 2000; Salgado *et al.* 2004).

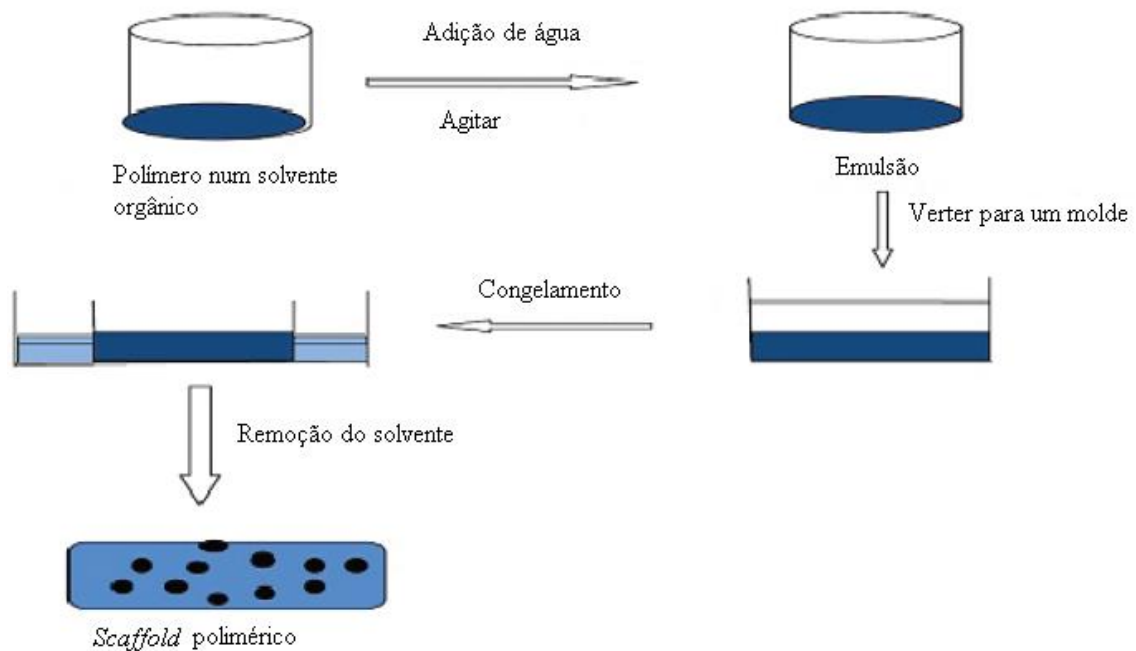


**Figura 13:** Técnica da formação de espumas gasosas (Garg *et al.* 2012).



**Figura 14:** *Scaffold* obtido por formação de espumas gasosas (Nazarov *et al.* 2004).

A formação de *scaffolds* por liofilização (Figuras 15 e 16) baseia-se na dissolução de uma solução polimérica num solvente orgânico, seguida da adição de água e subsequente remoção dos solventes por sublimação sob o vácuo. Tal como o método anterior, estas estruturas 3D exibem poros fechados e baixa estabilidade mecânica (Mikos e Temenoff, 2000; Salgado *et al.* 2004).

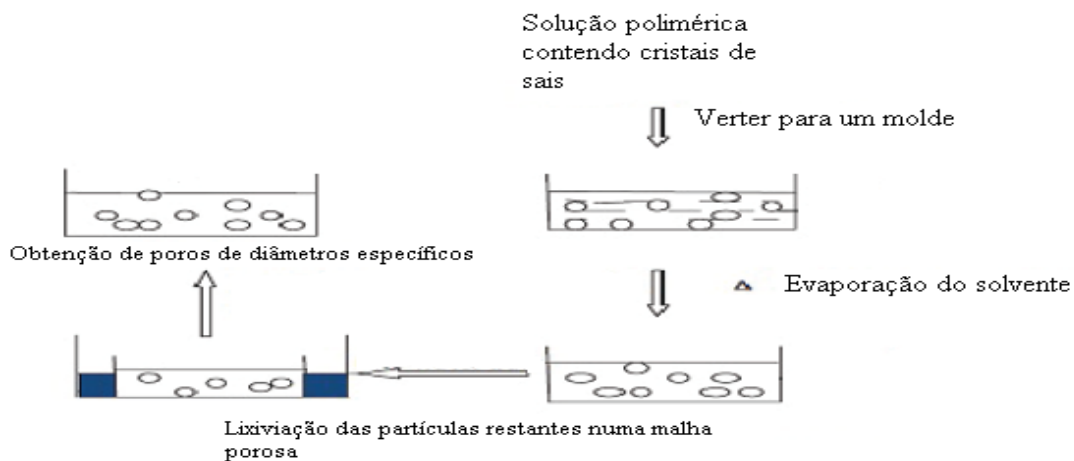


**Figura 15:** Esquema representativo da técnica de liofilização (Garg *et al.* 2012).



**Figura 16:** *Scaffolds* preparados por liofilização (Sultana e Wang, 2011).

A técnica de evaporação de solvente/lixiviação de partículas é a mais utilizada para preparação de *scaffolds*. Este método foi relatado pela primeira vez em 1994 por Mikos e os seus colaboradores. Trata-se de um processo simples que consiste numa mistura de cristais de sais solúveis (por ex. cloreto de sódio, tartarato de sódio, citrato de sódio) ou partículas orgânicas (por ex. sacarose numa solução polimérica), que posteriormente é vertida para um molde com a forma pretendida, onde se procederá à eliminação do solvente por evaporação ou liofilização. De seguida, as partículas que sobram são lixiviadas através de uma malha porosa, obtendo-se uma gama de diâmetros específicos dos poros. Este procedimento possui como limitações a utilização de solventes orgânicos tóxicos e a dificuldade em extrair as partículas solúveis do interior da matriz polimérica, o que confina à geração de membranas finas com tamanhos até 3mm (Liu e Ma, 2004; Mikos *et al.* 1994; Hutmacher, 2000; Salgado *et al.* 2004; Yang *et al.* 2001).

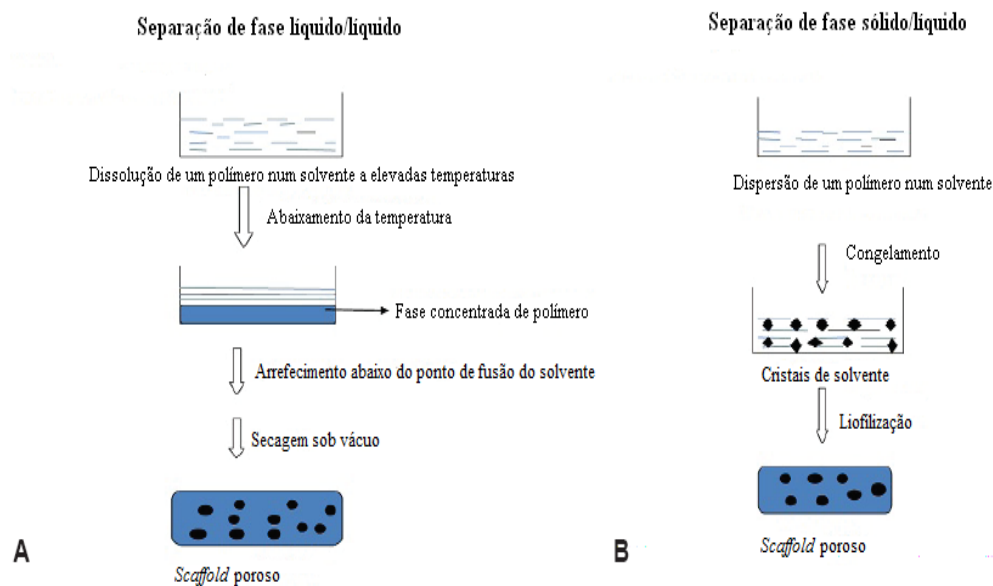


**Figura 17:** Representação da técnica evaporação de solvente/lixiviação de partículas (Adaptado de Garg *et al.* 2012).



**Figura 18:** *Scaffolds* obtidos pelo método de lixiviação de partículas (Asti *et al.* 2010).

O método de separação de fase baseia-se na dissolução de um polímero num solvente (por ex. fenol, naftaleno, ou dioxano) a elevada temperatura, seguida de um arrefecimento rápido, que origina a divisão do composto numa fase líquido-líquido ou sólido-líquido consoante a sua natureza e os valores da temperatura usada e posterior exclusão do solvente por sublimação. Esta técnica permite a produção de *scaffolds* porosos. Contrariamente às técnicas descritas anteriormente, os *scaffolds* obtidos exibem boas características mecânicas. No entanto, os poros gerados são de pequenas dimensões (Mikos e Temenoff, 2000; Yang *et al.* 2001).



**Figura 19:** Método da separação de fase conforme a divisão do composto numa fase líquido-líquido (A) ou sólido-líquido (B) (Garg *et al.* 2012).



**Figura 20:** *Scaffolds* preparados por separação de fase (Martinez-Pérez *et al.* 2011).

### 3.3.2.2. Técnicas modernas para a produção de *scaffolds* porosos

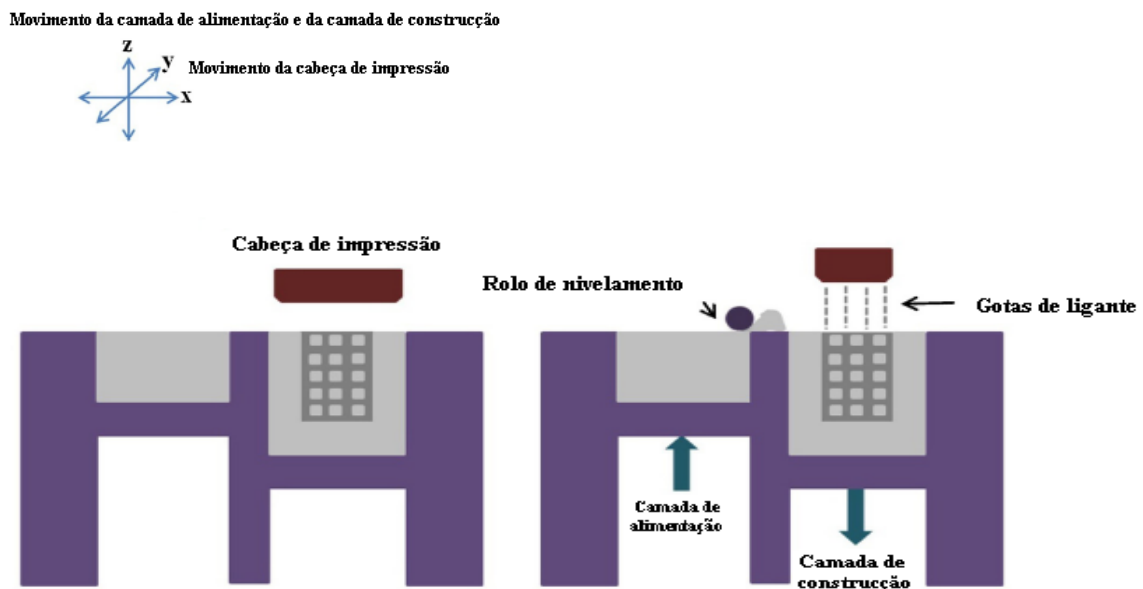
Com o progresso da tecnologia surgiram novas metodologias baseadas no conceito de produção assistida, que foi primeiramente inserido por Chuck Hull, em 1986, através de um método designado por estereolitografia (Hull, 1986). Estas novas técnicas conhecidas por prototipagem rápida ou fabrico sólido livre são computarizadas e regem-se por três princípios (Amini *et al.* 2012; Bose *et al.* 2013): i) o uso de um *software* de desenho assistido por computador (*Computer Assisted Design*) para a criação de um protótipo virtual, com a geometria e porosidade pretendidas para o *scaffold* a ser construído; ii) a transfiguração do protótipo criado em contínuas camadas através de um *software* de execução assistida por computador (*Computer Assisted Manufacturing*); iii) a elaboração do *scaffold* fundamentada na concepção de camada por camada pela adição de várias porções de material.

As técnicas de prototipagem rápida foram desenvolvidas com o intuito de preparar *scaffolds* personalizados para cada paciente, sendo particularmente importantes na reparação das lesões mais complicadas.

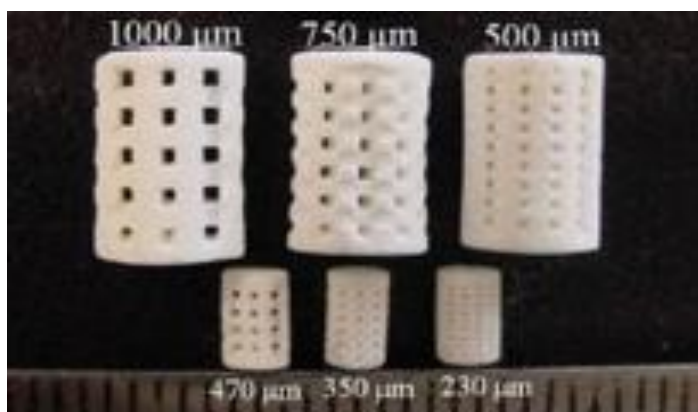
Entre estas destacam-se a impressão a três dimensões (*3D Printing*), a modelagem por fusão e deposição (*Fused Deposition Modeling*), a sinterização a laser (*Selective Laser Sintering*) e a estereolitografia (Melchels *et al.* 2010).

A impressão a três dimensões (Figura 21) foi desenvolvida no início da década de noventa, no Instituto de Tecnologia de Massachusetts, por Sachs e os seus colaboradores. Trata-se de uma técnica que aplica a impressão a jacto de tinta de um ligante no procedimento de materiais em pó (Sachs *et al.* 1992; Huttmacher, 2000).

Antes do início do processo, parâmetros como a densidade, fluidez e molhabilidade do pó, a espessura das camadas e o volume e saturação do ligante são otimizados para aumentar a qualidade do produto produzido. Este método permite a orientação do padrão do *scaffold* na área de fabrico através de um *software* de execução assistida por computador. O funcionamento da técnica inicia-se com a deposição de uma porção de pó uniforme na camada de alimentação, que posteriormente é dispersa por um rolo de nivelamento, para a camada de construção. De seguida, a cabeça de impressão pulveriza o ligante (pode ser de origem orgânica ou polimérica) sobre o pó, levando à ligação das partículas entre si na zona de produção. Após estes procedimentos, a camada de alimentação sobe enquanto a de construção desce, com o auxílio dos seus pistões, para delinear a espessura de uma nova camada de pó a ser depositada, seguida da adição do ligante, que depois é seco. Este mecanismo repete-se várias vezes até que o *scaffold* pretendido seja construído. A próxima etapa passa pela remoção do excesso de pó do *scaffold* por acção de ar comprimido (Bose *et al.* 2013). Esta metodologia permite o desenvolvimento de produtos com geometrias complexas (Figuras 21 e 22) num curto espaço de tempo a partir de modelos gerados pelo software de desenho assistido por computador e a incorporação de factores de crescimento. No entanto, apresenta como limitações o facto da porosidade do *scaffold* ser dependente da granulometria do pó e apresentação de poros fechados, a utilização de solventes orgânicos como ligantes e reduzidas características mecânicas (Liu e Ma, 2004).

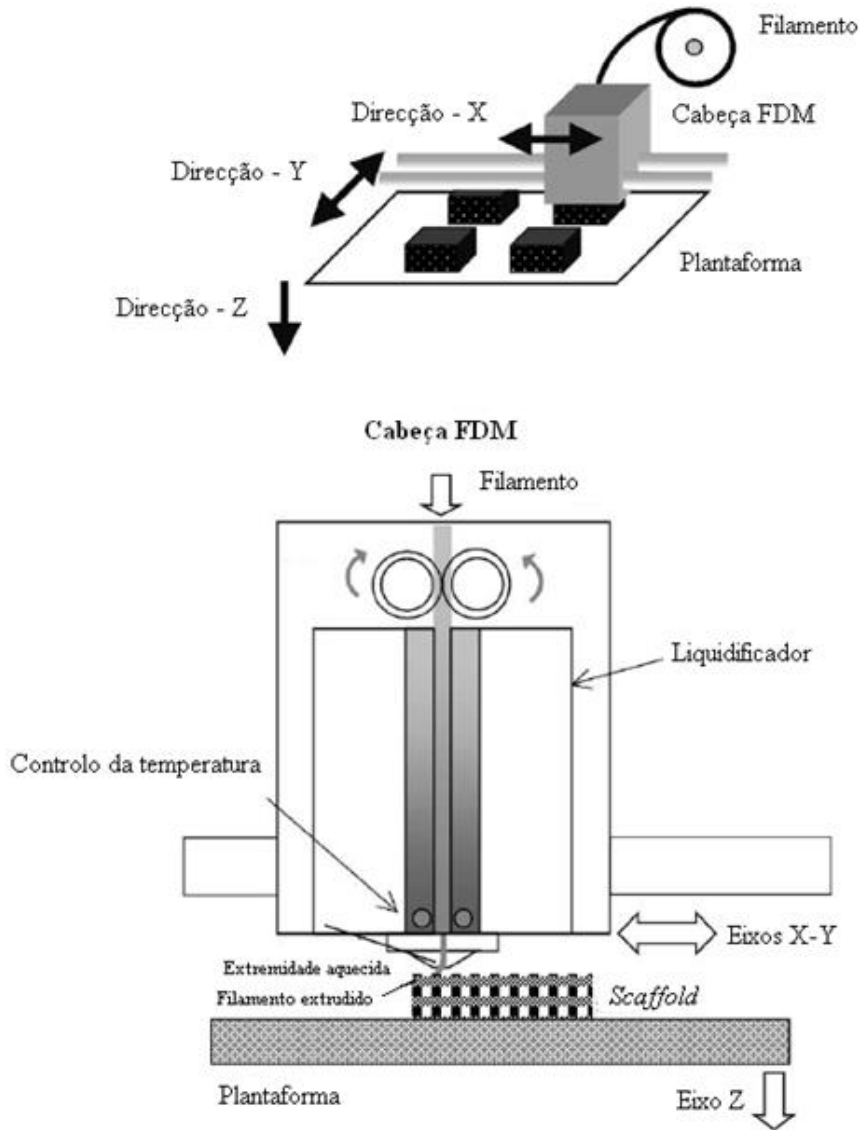


**Figura 21:** Sistema usado na impressão a três dimensões (Bose *et al.* 2013).

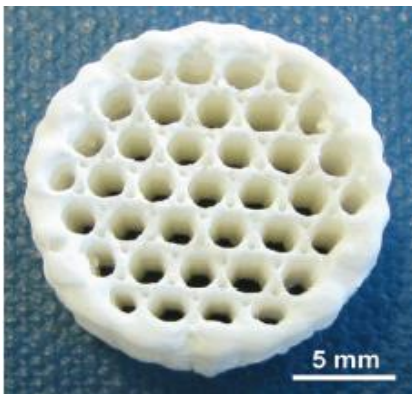


**Figura 22:** *Scaffolds* produzidos pela técnica de impressão a três dimensões (Tarafer *et al.* 2012).

A técnica da modelagem por fusão e deposição envolve a incorporação de um material fundido depositado em camadas ultra-finas. O princípio da técnica baseia-se na utilização de dois filamentos de material, um de construção e outro de suporte, que são movidos por dois cilindros rotativos, controlados pelo *software* de execução assistida por computador e uma extremidade que é aquecida para derreter o material, que compõe a cabeça de extrusão (Figura 23). Por sua vez, é esta que procede à extrusão da matéria fundida, que rapidamente solidifica e se deposita em camadas. Posteriormente a plataforma de construção desce para a adição de uma nova camada, repetindo-se este processo sucessivamente. A sua principal vantagem é a não utilização de solventes orgânicos. Contudo, a impossibilidade de associar factores de crescimento, as temperaturas elevadas e a gama restrita de polímeros passíveis de aplicação constituem inconvenientes (Hutmacher, 2000; Salgado *et al.* 2004). As Figuras 23 e 24 representam o princípio de funcionamento e um exemplo de um *scaffold* obtido pela técnica da modelagem por fusão e deposição.

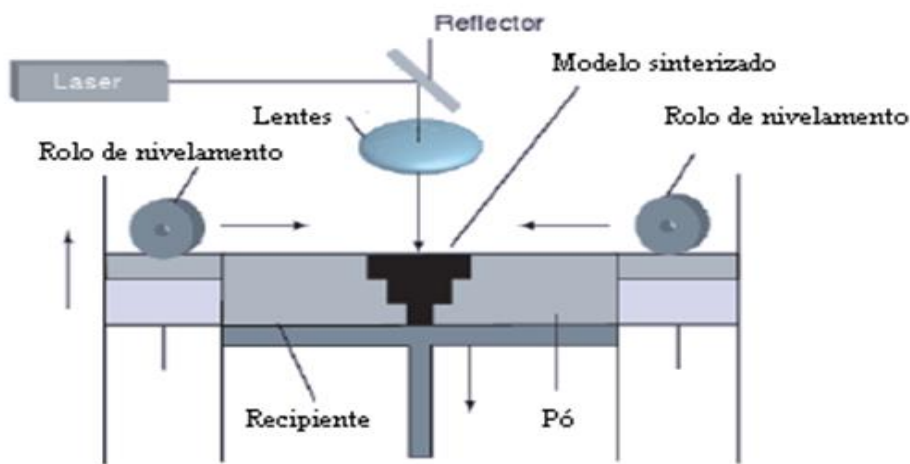


**Figura 23:** Funcionamento da técnica da modelagem por fusão e deposição (Zein *et al.* 2002).

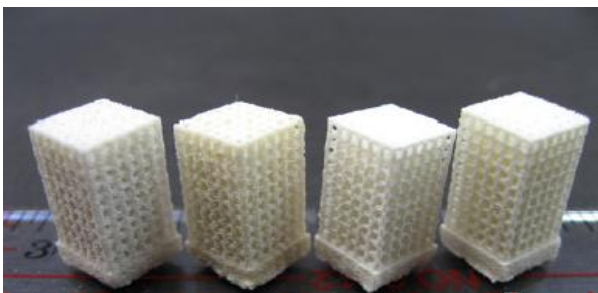


**Figura 24:** Scaffold sintetizado pela técnica da modelagem por fusão e deposição (Bergmann *et al.* 2014).

O método de sinterização a laser aplica um laser de dióxido de carbono para a fusão de variados materiais em pó (por ex. cera, policarbonato, cerâmicos e polímeros, como o *nylon*) ou seus compósitos e metais, na construção do *scaffold* pretendido. Tal como na impressão a três dimensões, o funcionamento desta técnica também tem início com a deposição de uma camada de pó com o auxílio de um rolo de nivelamento. Neste caso, quem se dispersa pela área de construção de forma a reproduzir a informação contida no *software* de desenho assistido por computador é o laser e não um ligante (Figura 25). Após terminada a primeira camada a plataforma de construção desce para a incorporação de uma nova camada, repetindo-se este processo continuamente. Com o objectivo de evitar a degradação dos materiais utilizados e proporcionar a introdução de agentes bioactivos ou células, pode ser efectuada uma alteração a esta técnica, através de um processo designado por sinterização selectiva a laser de superfície (*Surface Selective Laser Sintering*) (Antonov *et al.* 2004; Duan *et al.* 2010; Yang *et al.* 2002). As Figuras 25 e 26 ilustram, respectivamente, o princípio da técnica e um exemplo de um *scaffold* obtido pelo método de sinterização a laser.

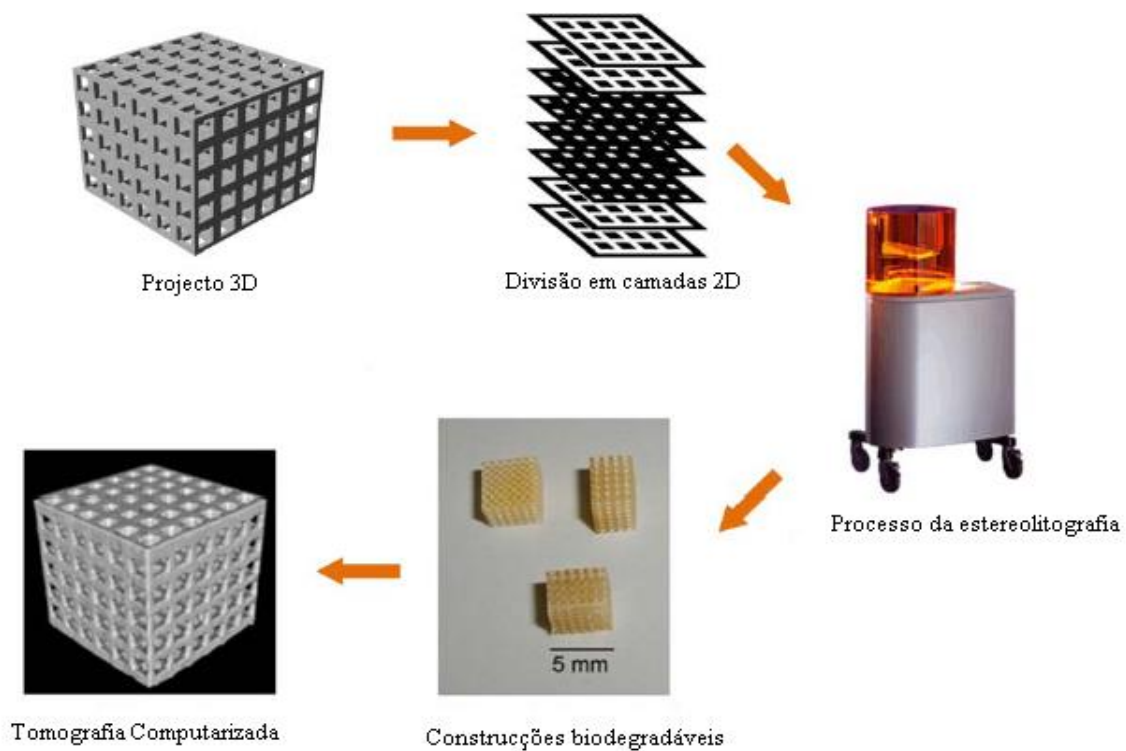


**Figura 25:** Mecanismo da técnica de sinterização a laser (Kathuria, 1999).



**Figura 26:** *Scaffolds* produzidos pelo método de sinterização a laser (Duan *et al.* 2010).

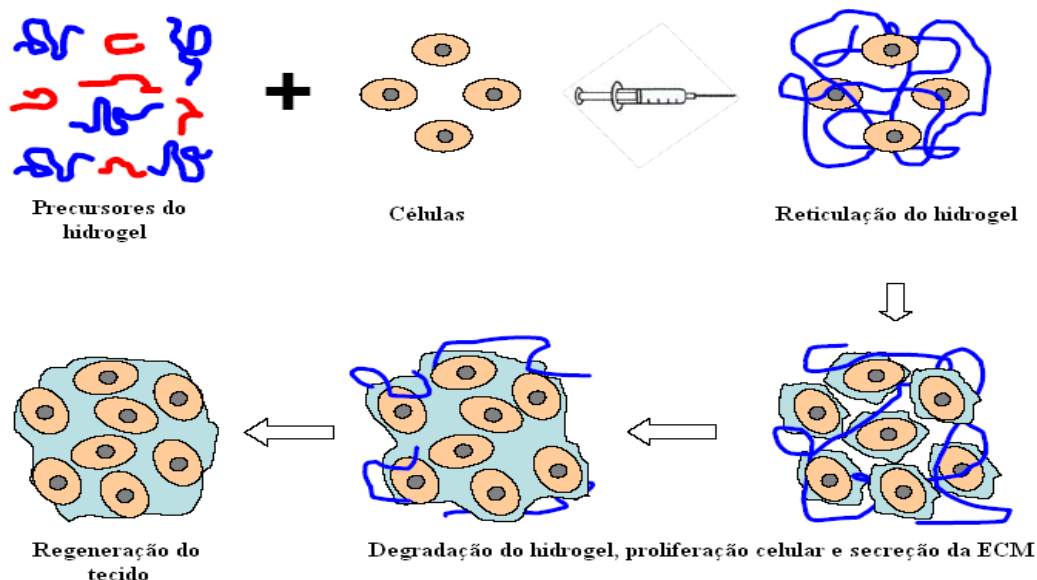
Como referido, a técnica da estereolitografia foi a primeira das metodologias de produção de *scaffolds* a ser comercializada. Embora a partir do seu surgimento tenham sido desenvolvidos novos métodos, este continua a ser dos mais versáteis e eficazes, exibindo uma exactidão superior, pois é capaz de produzir objectos de 20  $\mu$ , enquanto as outras produzem na gama 50-200  $\mu$ . Com efeito, o funcionamento da técnica da estereolitografia baseia-se na solidificação de uma resina líquida num padrão por fotopolimerização, que resulta da incidência de raios ultravioleta de um laser ou de luz, a partir de um projector digital controlado por um *software* de computador que conduz à aderência à plataforma de suporte, formando uma camada de uma espessura delineada. Após a fotopolimerização da primeira camada de resina, a plataforma desce à distância equivalente à espessura anterior e ocorre nova adição de resina, para se formar a camada seguinte e assim sucessivamente (Melchels *et al.* 2010). Na Figura 27 são exemplificados os processos envolvidos na técnica da estereolitografia.



**Figura 27:** Processos envolvidos na produção de estruturas por estereolitografia (Adaptado de Melchels *et al.* 2010).

### 3.3.2.3. Técnicas de produção de *scaffolds* à base de hidrogéis

Outra forma de preparação dos *scaffolds* é com recurso a sistemas de hidrogéis, que podem ser de origem natural ou sintética.



**Figura 28:** Funcionamento de hidrogéis injectáveis como *scaffolds* (Tan e Marra, 2010).

As primeiras técnicas desenvolvidas no âmbito da utilização de hidrogéis foram a polimerização de radicais livres e a adição de Michael. O primeiro método é caracterizado pela utilização de luz ultravioleta para a formação de radicais livres passíveis de serem usados na polimerização de vários grupos funcionais na produção de hidrogéis. Apresenta como vantagem a facilidade em polimerizar *in situ* e criar uma excelente cinética de gelificação. Por outro lado, o processo da adição de Michael é estabelecido pela conjugação de reacções de adição como as de diferentes grupos funcionais com materiais poliméricos, ou entre diferentes macrómeros (Selimović *et al.* 2012; Slaughter *et al.* 2009; Tan e Marra, 2010; Ward e Peppas, 2000).

A maior vantagem deste tipo de *scaffolds*, produzidos *in situ*, é o facto de estes puderem ser administrados via injectável associados a células e a factores de crescimento em solução. Após a administração, funcionam como sistemas de libertação prolongada das células no local da lesão (Chung e Park, 2007).

Com o intuito de criar hidrogéis capazes de simular as funcionalidades e as características dos tecidos do organismo, surgiram técnicas avançadas que permitem a produção de géis à microescala (i.e. microgéis) (Figuras 29 e 30). Estas incluem a emulsificação, micromodelação, fotolitografia, técnicas microfluídicas e impressão de gel (Slaughter *et al.* 2009).

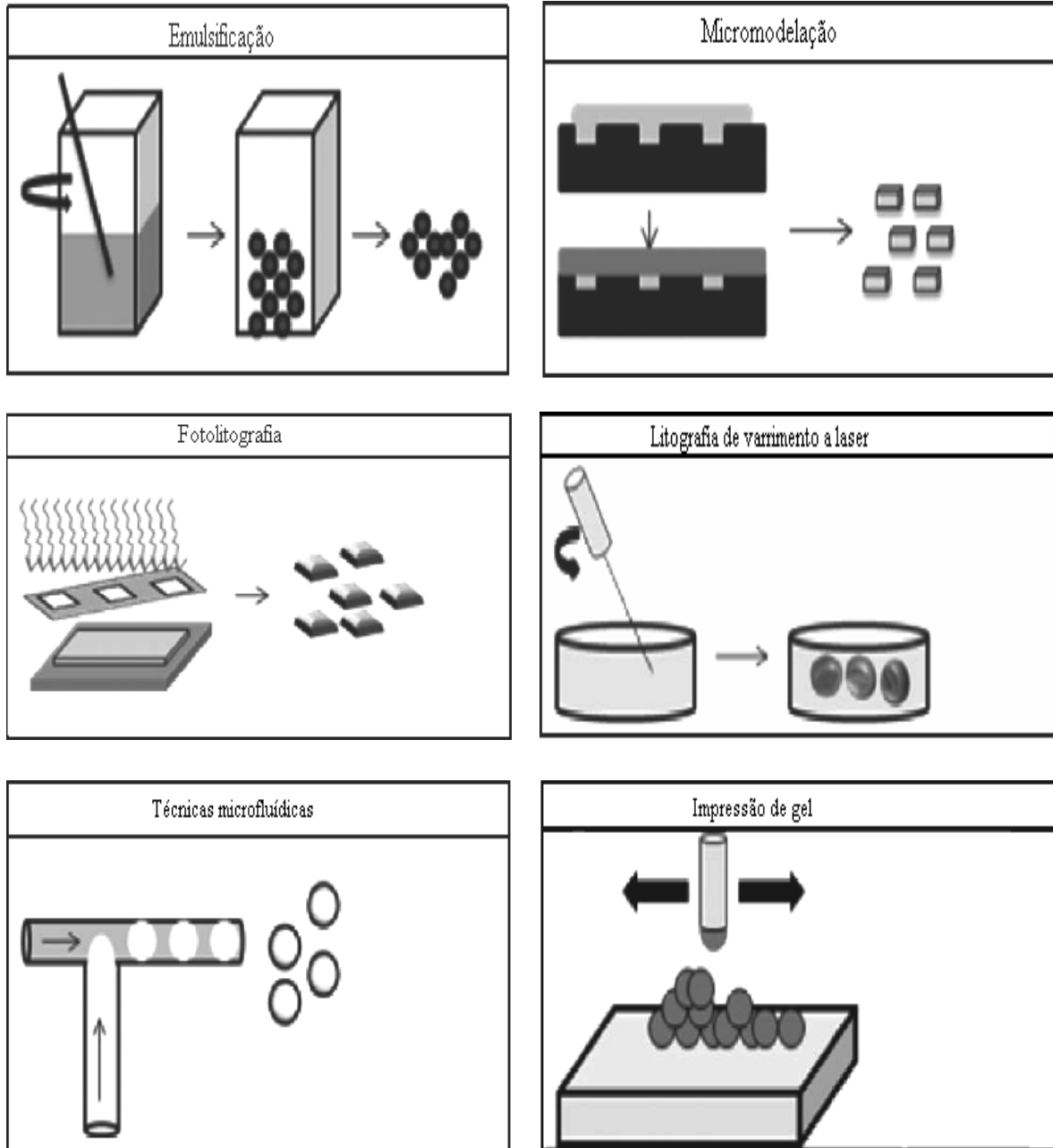
A emulsificação é uma metodologia empregue com a finalidade de produzir microesferas de hidrogel, que permitem efectuar trocas de oxigénio, nutrientes e produtos metabólicos entre as células e o ambiente circundante. Estas microesferas são produzidas a partir da dispersão de uma solução de um polímero de natureza hidrofóbica num solvente adequado, seguida da evaporação do mesmo solvente. A formação das microesferas acontece devido à volatilidade do solvente, que ao ser evaporado lentamente da emulsão, leva à precipitação do polímero (Slaughter *et al.* 2009).

O método da micromodelação baseia-se na criação de um molde responsável pela forma do hidrogel, seguida da reticulação do mesmo, em que um precursor de um determinado polímero no estado líquido preenche o molde, que é pressionado, excretando o líquido em excesso. Posteriormente ocorre a sua solidificação, mas mantém-se aderente ao molde até este ser removido (Selimović *et al.* 2012).

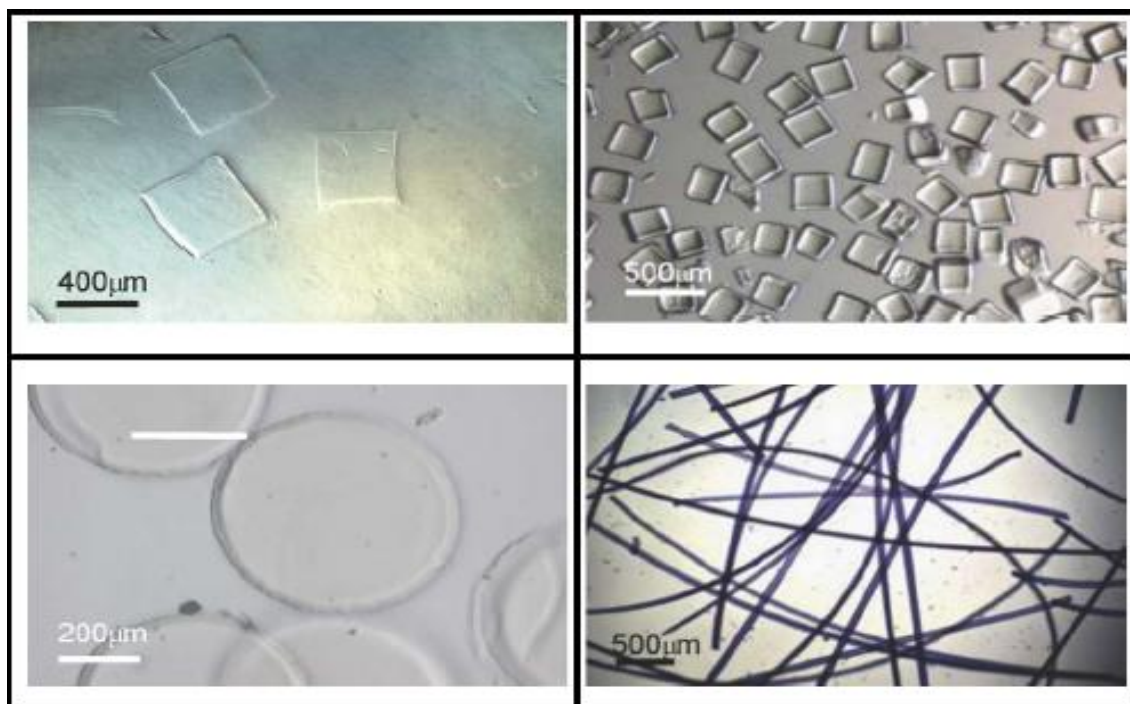
O processo da fotolitografia envolve exposição de luz sobre os precursores do hidrogel nas áreas específicas em que serão reticulados. Neste mecanismo para se proceder à incorporação de células é necessário que estas sejam previamente suspensas num precursor do polímero, devido à citotoxicidade do fotoiniciador e da exposição de luz ultravioleta. Outra vertente deste procedimento é a utilização de luz proveniente de laser para reticular polímeros hidrofílicos fotoactivos através de um método designado por litografia de varrimento a laser (*Laser Scanning Lithography*) (Selimović *et al.* 2012; Slaughter *et al.* 2009).

As técnicas microfluídicas baseiam-se numa série de metodologias que têm o objectivo de preparar hidrogéis com fluxos simples ou multifásicos em canais microfluídicos, utilizados para encapsular células no interior de gotículas de soluções de polímeros (Selimović *et al.* 2012; Slaughter *et al.* 2009).

A impressão de gel é uma técnica que permite produzir tecidos tridimensionais *in vitro* a partir de microgeles associados a células. Tal como metodologias anteriores, envolve a deposição camada por camada das células no interior de um gel tridimensional controlada por um *software* de desenho assistido por computador (Mironov *et al.* 2003; Selimović *et al.* 2012; Slaughter *et al.* 2009).



**Figura 29:** Técnicas usadas na produção de microgeles (Slaughter *et al.* 2009).



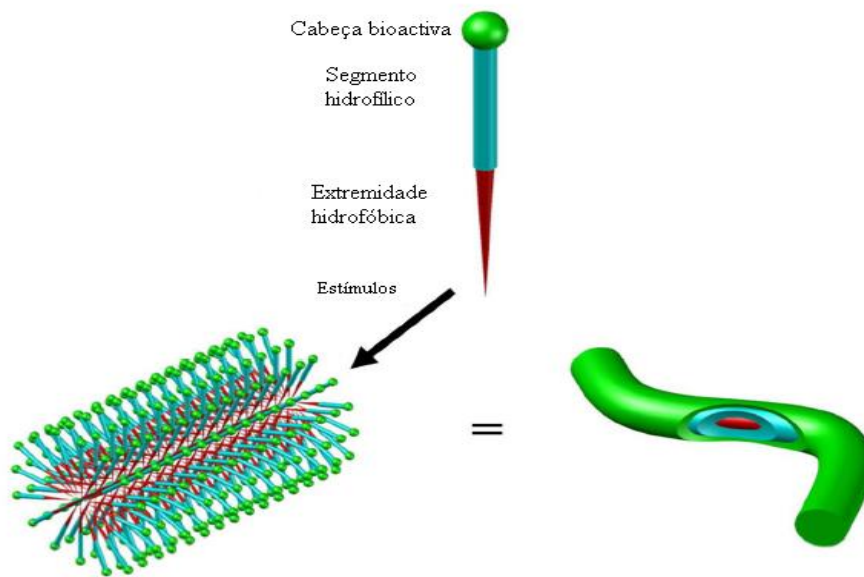
**Figura 30:** Exemplos de microgeles com diferentes formas (Yeh *et al.* 2006).

#### 3.3.2.4. Técnicas de produção de *scaffolds* fibrosos

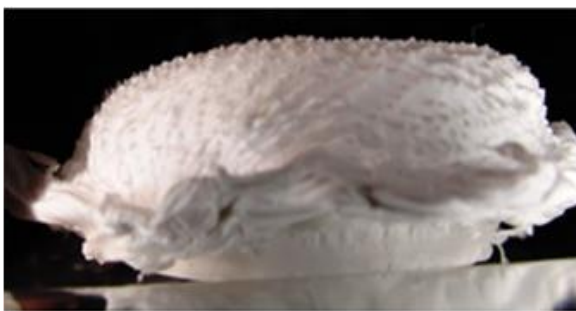
Os *scaffolds* ainda podem ser do tipo fibroso, constituídos por redes de nanofibras provenientes de vários polímeros, aptas para retratarem a arquitectura da matriz extracelular óssea, e por uma estrutura microporosa. Em conjunto, estas estruturas promovem a adesão, a proliferação e a diferenciação celular. Actualmente a produção destas fibras ocorre recorrendo-se às técnicas da auto-montagem, da separação de fase e electrofiação (Dhandayuthapani *et al.* 2011).

O método de auto-montagem (Figuras 31 e 32) é um procedimento laboratorial inspirado na organização própria de várias moléculas existentes na natureza, como proteínas e péptidos ou na disposição das moléculas de colagénio na matriz extracelular óssea. O objectivo é produzir estruturas nanofibrosas através do desenvolvimento de materiais capazes de se difundirem espontaneamente, em um modelo passível de reproduzir as características estruturais dos sistemas biológicos. As unidades mais utilizadas na construção destas estruturas são os péptidos anfífilicos (Smith *et al.* 2008; Zhang, 2003). O processo de auto-montagem é usado para formar estruturas ordenadas e

estáveis, mantidas por interações não covalentes, como as interações hidrofóbicas, de van der Waals, electrostáticas e as ligações de hidrogénio (Rajagopal e Schneider, 2004; Zhang, 2003). Apesar de conduzir à produção de nanofibras com poros de tamanhos homogéneos, trata-se de um procedimento complexo e de produção em pequena escala. Os *scaffolds* resultantes são mecanicamente frágeis e o tamanho e estrutura dos seus poros e a sua taxa de degradação não são controláveis (Chen *et al.* 2013; Smith *et al.* 2008; Vasita e Katti, 2006).

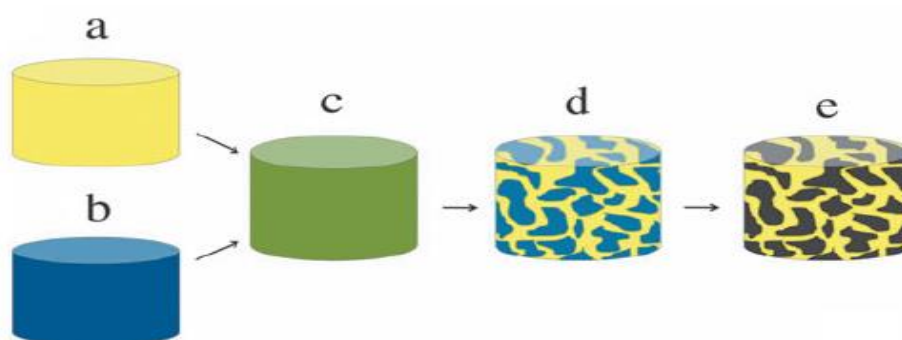


**Figura 31:** Técnica de auto-montagem utilizando péptidos anfifílicos (Zhang *et al.* 2012).



**Figura 32:** *Scaffold* fibroso preparado pela técnica de auto-montagem (Ahirwal *et al.* 2013).

A separação de fase (Figuras 33 e 34) é um método desenvolvido por Ma e Zhang, que surgiu na tentativa de reproduzir a estrutura tridimensional das fibras de colagénio que compõem a matriz extracelular óssea. Esta metodologia consiste na dissolução de um polímero em solução seguida da separação termodinâmica da fase líquido-líquido. Posteriormente é adicionado um solvente para favorecer a formação de um gel. Após arrefecimento do gel é efectuada a liofilização para eliminar o solvente, levando à produção do *scaffold*. (Ma e Zhang, 1999; Martinez-Pérez *et al.* 2011). Contrariamente à técnica anterior, este é um procedimento simples que não recorre a equipamento especializado, embora a sua produtividade também esteja restrita à escala laboratorial. No entanto, a estrutura macroporosa resultante pode ser controlada pela incorporação de porógenos (partículas de forma e tamanho específicos usadas para criar poros nas estruturas em Engenharia de Tecidos) no decorrer da etapa da separação (Jayaraman *et al.* 2004; Kim *et al.* 2009; Smith e Ma, 2004).

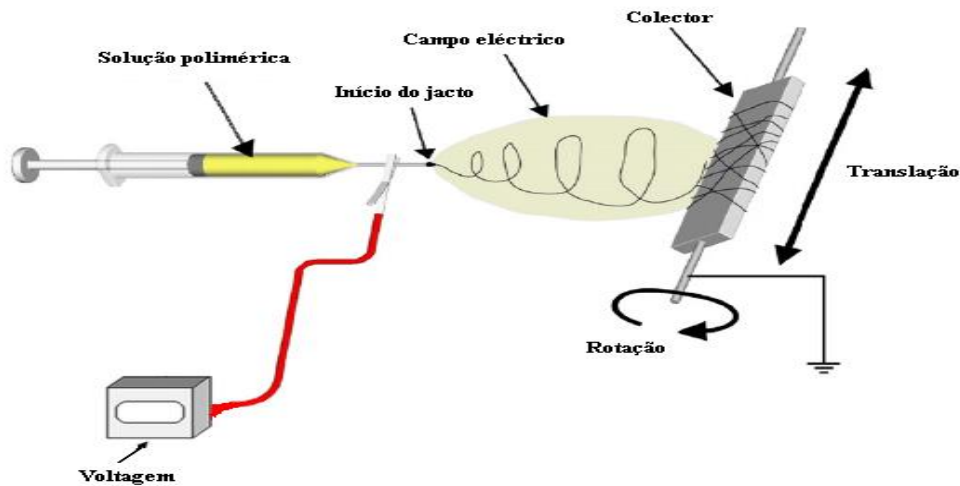


**Figura 33:** Esquema representativo da técnica de separação de fase. O polímero (a) é dissolvido no solvente (b) formando uma solução (c) que é rapidamente arrefecida, induzindo e conduzindo à separação de fases (polímero e solvente) (d). Posteriormente o solvente é removido (e), formando-se uma rede de nanofibras (Dahlin *et al.* 2011).

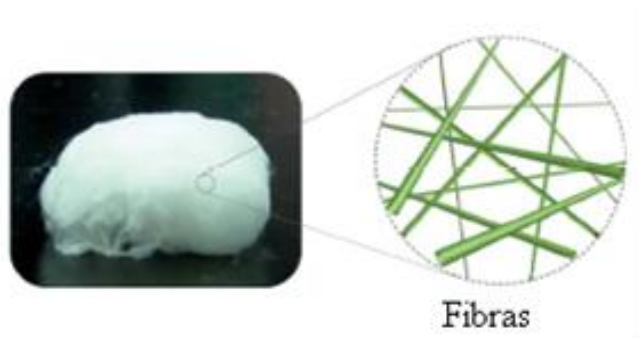


**Figura 34:** Rede de nanofibras obtida pela técnica de separação de fase (Samitsu *et al.* 2013).

A metodologia da electrofiação (Figuras 35 e 36) é a mais estudada e compreende a aplicação de um campo eléctrico para induzir a criação e o acondicionamento das fibras de vários materiais num colector metálico, estático ou rotativo. Este procedimento inicia-se com a manutenção de uma solução polimérica na extremidade de uma agulha graças à tensão de superfície, recorrendo-se a uma alta voltagem para gerar um campo eléctrico que vai originar uma repulsão de cargas no interior da solução. Esta repulsão conduz à oposição da tensão superficial até a ultrapassar, formando-se um jacto que se dirige até ao colector. Durante a movimentação do jacto, ocorre a evaporação do solvente e o desenvolvimento das fibras que serão aí dispostas (Barnes *et al.* 2007; Dhandayuthapani *et al.* 2011; Pham *et al.* 2006). O uso desta técnica permite a produção de redes de fibras à micro e nano escala, em que estas últimas apresentam elevada porosidade e área de superfície, mas exibem baixas características mecânicas, de biodegradabilidade e osteocondutividade, que podem ser melhoradas pela incorporação ou revestimento de partículas cerâmicas nos *scaffolds* (Vasita e Katti, 2006).



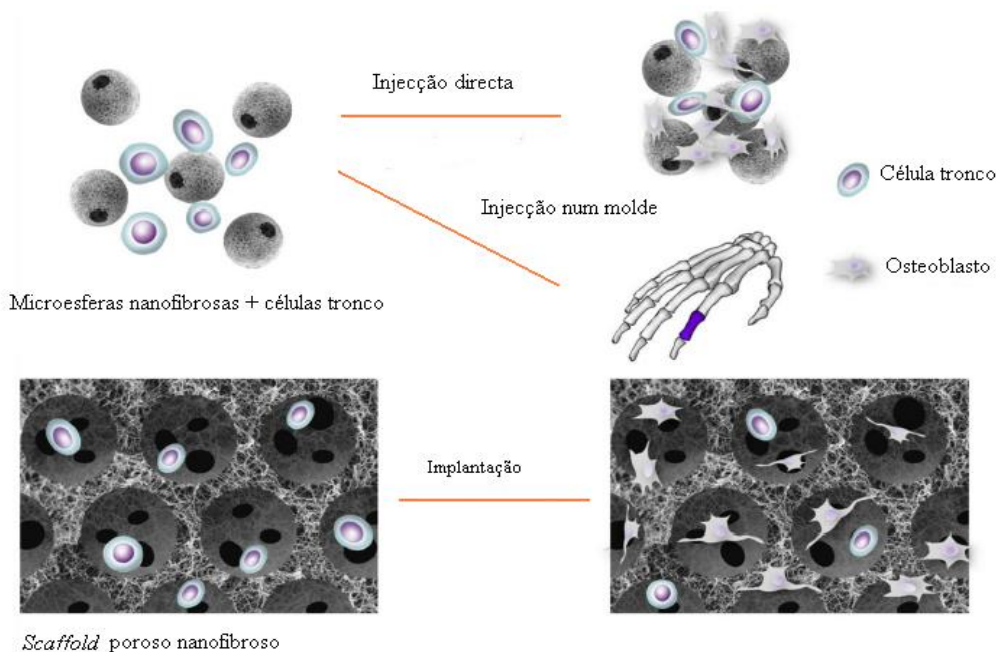
**Figura 35:** Funcionamento da técnica de electrofiação (Barnes *et al.* 2007).



**Figura 36:** Scaffold fibroso obtido por electrofiação (Adaptado de Jin *et al.* 2012).

### 3.3.2.5. Técnicas de produção de *scaffolds* à base de microesferas

A produção de *scaffolds* baseados em microesferas (Figura 37) é usada para administração injectável, com o objectivo de proporcionar suporte ao crescimento celular e funcionar como um transportador de factores de crescimento, aumentando a proliferação e propagação celular (Makhaik, 2013). Além disso, as microesferas podem também ser incorporadas nas matrizes porosas convencionais, em combinação com células e factores de crescimento, para obter uma libertação prolongada dessas moléculas sem comprometer as características do *scaffold*. As microesferas podem ainda aumentar a porosidade dos biomateriais que compõem os *scaffolds* e melhorar as suas propriedades mecânicas (Mouriño e Boccaccini, 2010; Wang *et al.* 2012). São unidades de produção fácil e permitem o controlo da morfologia e das características físico-químicas dos *scaffolds*. Alguns dos métodos empregues na elaboração de microesferas são a sinterização a quente, tratamentos de vapores de solventes e o método de sinterização. Estas técnicas envolvem a exposição a altas temperaturas ou o uso de solventes orgânicos, o que pode restringir a suas aplicações (Brown *et al.* 2008; Jacklenec *et al.* 2008; Nukavarapu *et al.* 2008).

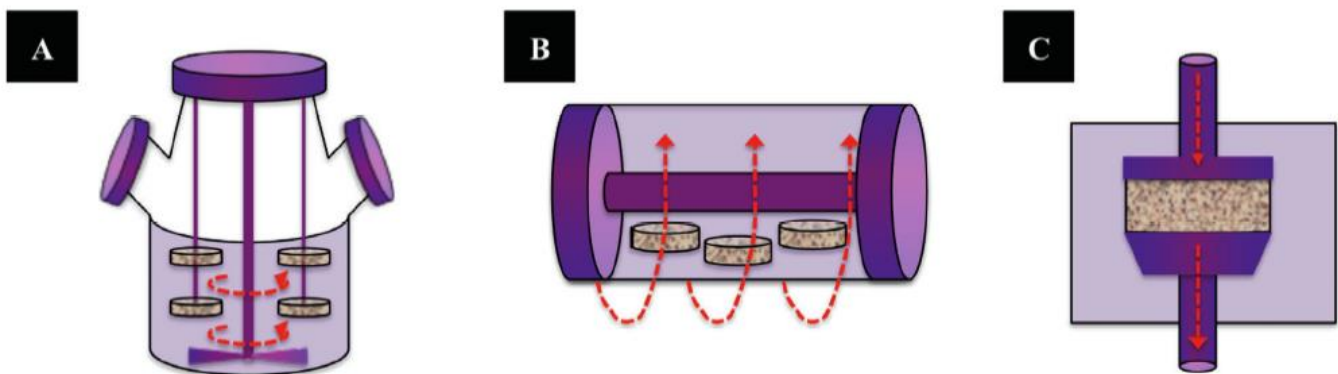


**Figura 37:** Distribuição de células tronco a partir de microesferas nanofibrosas (Zhang *et al.* 2012).

### 3.3.2. Células, factores de crescimento e vascularização

Como referido ao longo deste trabalho, a preparação de *scaffolds* no âmbito da Engenharia de Tecidos surgiu como uma estratégia para aumentar a capacidade de reparação e regeneração óssea. Para estimular e melhorar os processos são adicionadas células ósseas precursoras e factores de crescimento aos *scaffolds* aliados a uma vascularização capaz de facilitar o acesso aos nutrientes e oxigénio necessários (Amini *et al.* 2012).

As células mais usadas são as células tronco mesênquimais, extraídas da medula óssea do paciente. Estas são cultivadas *in vitro* para proliferar e mais tarde serem reimplantadas no paciente (Alvarez e Nakajima, 2009). Com o intuito de melhorar o desempenho das células osteogénicas *in vitro*, são utilizados biorreactores que pretendem simular o ambiente dinâmico e mecânico *in vivo* (Bancroft *et al.* 2003). Estes são sistemas automatizados que, além de reproduzirem o ambiente *in vivo* das células, também permitem a produção automática e padronizada de tecidos com custos reduzidos, o que favorece o uso da Engenharia de Tecidos em larga escala. Neste sentido, podem ser usados diferentes tipos de biorreactores (Figura 38), destacando-se os de tanque agitado, os de tanque tubular e os abertos (Amini *et al.* 2012).



**Figura 38:** Biorreactores utilizados em Engenharia de Tecidos ósseos: (A) – Biorreactor de tanque agitado; (B) – Biorreactor de tanque tubular; (C) – Biorreactor aberto (Adaptado de Martin *et al.* 2004).

O biorreactor de tanque agitado (Figura 38 A) é o tipo mais simples e económico. O funcionamento deste sistema baseia-se na formação de forças de convecção a partir de uma barra magnética, que permite a mistura contínua de meio com os *scaffolds*

incorporados com células, que se encontram presos a agulhas suspensas na tampa do biorreactor. (Amini *et al.* 2012; Sikavitsas *et al.* 2002; Stiehler *et al.* 2009). O biorreactor de tanque tubular (Figura 38 B) permite a manutenção das células num estado de microgravidade, devido à constante rotação, que evita a deposição das células, ao mesmo tempo que impulsiona as interacções entre elas (Sikavitsas *et al.* 2002). O biorreactor aberto (Figura 38 C) é o mais utilizado. É constituído por uma câmara que alberga os *scaffolds* incorporados com as células e por uma bomba que coloca os *scaffolds* em contacto com o meio de cultura. Este mecanismo não só possibilita uma distribuição homogénea das células pelos *scaffolds*, como também aumenta a sua densidade, proliferação, diferenciação e deposição da matriz extracelular óssea no *scaffold* (Bancroft *et al.* 2003; Goldstein *et al.* 2001).

Uma estratégia utilizada para aumentar o crescimento ósseo que realça o potencial osteoindutivo e osteocondutivo das células precursoras contidas nos *scaffolds* é a adição de factores de crescimento (Hughes *et al.* 2006). Estes são polipéptidos sintetizados e libertados em quantidades fisiológicas, que funcionam como reguladores locais da acção das células estando presentes naturalmente na matriz óssea saudável sendo também libertados durante o processo de reparação da lesão, para induzir a diferenciação das células ósseas (Solheim, 1998).

Além das células e dos factores de crescimento, outro factor importante no desempenho dos *scaffolds* é a vascularização. Se esta for inadequada ou escassa pode originar diferenciação celular irregular ou morte celular, por falta de nutrientes e oxigénio (Bose *et al.* 2012). Para melhorar e acelerar a criação de novos vasos sanguíneos foram desenvolvidos vários métodos, tais como (Amini *et al.* 2012; Huang *et al.* 2005): o aumento do tamanho e da interligação dos poros recorrendo-se a novas técnicas de produção de *scaffolds* referidas anteriormente; a inclusão de factores de crescimento angiogénicos nos *scaffolds*; a inclusão de factores de crescimento angiogénicos nas células cultivadas *in vitro*, previamente modificadas geneticamente, ocorrendo a libertação simultânea de factores osteogénicos e angiogénicos. Esta última técnica é mais eficaz na formação de vasos sanguíneos e na regeneração óssea, comparativamente à libertação de factores de crescimento isolados e à necessidade de utilizar factores de crescimento recombinantes de elevado custo, para modificar geneticamente as células. Podem ainda ser usadas técnicas *in vitro* e *in vivo* de pré-vascularização. As técnicas *in*

*in vitro* recorrem à cultura de células endoteliais em conjunto com células osteogénicas em *scaffolds*. A interacção entre os dois tipos de células conduz à criação de vasos imaturos por parte das células endoteliais, que poderão maturar e recombinar com a vascularização do paciente, após implantação. Esta estratégia além de acelerar a vascularização *in vivo*, aumenta a diferenciação das células osteoprogenitoras *in vitro* e a criação de osso novo *in vivo* (Buschmann *et al.* 2011; Fuan *et al.* 2014). A pré-vascularização *in vivo* pode ser realizada por dois modos distintos. No primeiro, o *scaffold* é introduzido em tecido vascular axial, resultando na geração de uma rede microvascular no interior do *scaffold*, após algumas semanas. Posteriormente esta matriz tridimensional é transferida para o local da lesão, sendo a sua rede ligada por um procedimento cirúrgico, designado por técnica de anastomose vascular microcirúrgica. Este processo apresenta como desvantagens a necessidade de fazer duas cirurgias, os custos elevados, a morbidez do local dador e o facto do grau de vascularização resultante ser estabelecido a partir da vascularização do tecido do paciente no local da lesão. O outro processo está relacionado com a introdução de vasos adequados para a transposição microcirúrgica no interior dos *scaffolds*, não sendo necessárias as duas intervenções cirúrgicas do método anterior e não dependendo do estado da vascularização perto do local da lesão (Amini *et al.* 2012; Casell *et al.* 2002; Tanaka *et al.* 2003).

### 3.4. Avaliação dos *scaffolds*

Após a preparação de biomateriais médicos, como os *scaffolds*, é necessário avaliar as suas funcionalidades e o cumprimento dos requisitos para uso humano, através de ensaios pré-clínicos (Salgado *et al.* 2004). Para o efeito, recorre-se a ensaios *in vitro* e *in vivo* para testar a biocompatibilidade. Em relação aos primeiros, os *scaffolds* ou outros biomateriais são analisados tendo em conta o modo como actuam, em contacto directo ou indirecto com uma cultura de células. Os resultados baseiam-se na observação de alterações na morfologia das células. Nos métodos de contacto directo, normalmente uma suspensão de células é cultivada sobre o biomaterial (ou *scaffold*) a analisar e a apreciação do estado das células (vivas ou mortas) é baseada na sua perda ou não de aderência à cultura, determinando-se assim a citotoxicidade do material. Nos métodos de contacto indirecto, podem ser usadas dois tipos de técnicas. A primeira

consiste na separação do biomaterial a testar da linha de células usada, recorrendo a uma barreira de difusão colocada entre o material e as células. Esta barreira é geralmente formada por uma camada de agar, que contém um corante que é absorvido pelas células vivas, enquanto as mortas ou danificadas permanecem sem cor. O outro procedimento utilizado consta na adição de um extrato do biomaterial a uma monocamada de células, que são posteriormente incubadas. A distinção entre células vivas ou mortas é também realizada com recurso a um corante. O grande inconveniente dos estudos *in vitro* é a necessidade de extrapolação dos resultados para o ambiente fisiológico, sendo requerida a realização posterior de ensaios *in vivo* em modelos animais. No entanto, os testes *in vitro* minimizam o número de estudos em animais, o que é uma importante vantagem (Hanson *et al.* 2004).

Os testes *in vivo* são efectuados através da implantação dos *scaffolds* em modelos animais diferentes (Costa-Pinto *et al.* 2011). Geralmente os primeiros ensaios são efectuados em ratos, sendo os *scaffolds* introduzidos nas zonas intraperitoneais, intramusculares, mesentéricas e subcutâneas. Estes modelos são úteis para verificar se características de porosidade e a interligação são adequadas à regeneração óssea, à vascularização e à osteoindução do tecido (Costa-Pinto *et al.* 2011; Salgado *et al.* 2004). Na última fase dos ensaios pré-clínicos em engenharia de tecidos ósseos devem ser usados animais com metabolismo, fisiologia e anatomia similares aos humanos, com intuito de simular o mais possível a situação clínica e o ambiente *in vivo*. Para o efeito recorre-se a animais de maior porte, como o porco, a ovelha ou a cabra, que exibem um peso e uma taxa de remodelação óssea semelhantes à dos humanos (Costa-Pinto *et al.* 2011). As respostas locais dos materiais inseridos são avaliadas qualitativamente e quantitativamente, por vários métodos computadorizados de histologia, histoquímica, inumo-histoquímica e bioquímica. Estes métodos permitem a obtenção de dados acerca da qualidade e quantidade do novo osso, como a sua densidade e estrutura, através da visualização de imagens que possibilitam a determinação de diversos parâmetros, como a quantificação da área de tecido ósseo, a espessura e a zona de tecido ósseo não mineralizado, a área superficial coberta de osteoblastos, o espaço vazio e a espessura das trabéculas (Hanson *et al.* 2004; Salgado *et al.* 2004).

#### 4. Conclusões

Os problemas ósseos são frequentes em todo o mundo e conduzem à debilidade dos pacientes. Na tentativa da sua resolução começaram por ser empregues implantes e próteses ortopédicas que apesar do êxito que alcançaram na melhoria da qualidade de vida de vários pacientes apresentam várias limitações.

Nos últimos anos os progressos na área da Medicina Regenerativa levaram ao uso de enxertos ósseos, constituindo actualmente uma terapêutica bem estabelecida, apesar de também apresentarem desvantagens. A fim de colmatar as restrições desta terapia emergiu a Engenharia de Tecidos, que tem como base o aumento dos conhecimentos relativos à composição e fisiologia do tecido ósseo, das células tronco mesênquimais e do desenvolvimento de novos biomateriais. Nesta área têm vindo a ser utilizadas matrizes tridimensionais conhecidas por *scaffolds*, usadas para estimular e auxiliar a reparação e reconstrução das lesões ósseas. A sua produção tem vindo a ser aperfeiçoada através do desenvolvimento de novas metodologias e, de técnicas computadorizadas, o que tem permitido melhorar a porosidade, as taxas de degradação e as propriedades mecânicas dos *scaffolds*. No entanto, apesar da obtenção de resultados satisfatórios é necessário desenvolver e estudar novas técnicas de processamento, principalmente as que conduzem ao aumento das características mecânicas sem interferir com a porosidade e interligação dos *scaffolds*.

Com este trabalho de pesquisa bibliográfica é fácil concluir que a Engenharia de Tecidos ósseos constitui uma terapêutica promissora para a substituição óssea. Além disso, esta área apresenta um enorme potencial que deve ser desenvolvido, para a sua afirmação e reconhecimento, tanto pela comunidade médica, como pelo público em geral.

## 5. Referências bibliográficas

Ahirwal, D; Hébraud, A; Kádár, R; Whilhelm, M; Schlatter, G. (2013). From of electrospun nanofibers to 3D cm thick hierarchical foams. *Soft Matter*, 9, pp. 3164-3172

Alvarez, K; Nakajima, H. (2009). Metallic scaffolds for bone regeneration. *Materials*, 2, pp. 790-832

Amini, A; Laurencin, C; Nukavarapu, S. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical of Review in Biomedical Engineering*, 40, pp. 363-408

Anderson, J. (2001). Biological responses to materials. *Annual Review of Materials Research*, 31, pp. 81-110

Antonov, E; Bragatashvili, V; Whitaker, M; Barry, J; Shakesheff, K; Konovalov, A; Propov, V; Howdle, S. (2004). Three-dimensional bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by surface-selective laser sintering. *Advanced Materials*, 17, pp. 327-330

Aravamudhan, A; Ramos, D; Nip, J; Harmon, M; James, R; Deng, M; Laurencin, C; Yu, X; Kumbar, S. (2013). Cellulose and collagen derived micro-nano structured scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, pp. 719-731

Asti, A; Gastaldi, G; Dorati, R; Saino, E; Conti, B; Visai, L; Benazzo, F. (2010). Stem cells grown in osteogenic medium on plga, plga/ha, and titanium scaffolds for surgical applications. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2010, pp. 831031-831042

Baarsen, L; Bos, C; Kraan, T; Verweij, C. (2009). Transcription profiling of rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 11, pp. 207-219

Bancroft, G; Ph, D; Sikavtisas, V; Mikos, A. (2003). Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Engineering*, 9, pp. 549-554

Banhart, J. (2001). Manufacture, characterisation and application of cellular metals and metals foams. *Progress in Materials Science*, 46, pp. 559-632

Barnes, C; Sell, S; Boland, E; Simpson, D; Bowlin, D. (2007). Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 1413-1433

Bergmann, C; Odekerken, J; Welting, T; Jungwirth, F; Devine, D; Bouré, L; Zeiter, S; Rhijn, L; Telle, R; Fisher, H; Emans, P. (2014). Calcium phosphate based three-dimensional cold plotted bone scaffolds for critical size bone defects. *BioMed Research International*, 2014, pp. 852610-852619

Bose, S; Roy, M; Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30, pp. 546-554

Bose, S; Vahabzadeh, S; Bandyopadhyay, A. (2013). Bone tissue engineering using 3D printing. *Materials Today*, 16, pp. 496-504

Brown, J; Nair, L; Laurencin, C. (2008). Solvent/non solvent sintering: a novel route to create porous microsphere scaffolds for tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research B*, 86, pp. 396-408

Buck, D; Dumanian, G. (2012). Bone biology and physiology: part I. the fundamentals. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 129, pp. 1314-1320

Buschmann, J; Ph, D; Welti, M; Hemmi, S; Neuenschwander, P; Baltes, C; Giovanoli, P; Rudin, M; Calcagni, M. (2011). Three-dimensional co-cultures of osteoblasts and endothelial cells in DegraPol foam: histological and high-field magnetic resonance imaging analyses of pre-engineered capillary networks in bone grafts. *Tissue Engineering: Part A*, 17, pp. 291-299

Casell, O; Hofer, S; Morrison, W; Knight, K. (2002). Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British Journal of Plastic Surgery*, 55, pp. 603-610

Chen, H; Muller, R; Blitterswijk, C; Moroni, L. (2013). Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications. In: Gaharwar, A, Sant, S; Hancock, M; Hacking, S. (Eds.). *Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and applications*, Woodhead Publishing Series in Biomaterials, pp. 158-182

- Chen, L; Zhu, W; Fei, Z; Chen, J; Xiong, J; Zhang, J; Duan, L; Huang, J; Liu, Z; Wang, D; Zeng, Y. (2013). The study on biocompatibility of porous nHa/PLGA composite scaffolds for tissue engineering with rabbit chondrocytes in vitro. *Biomed Research International*, 2013, pp. 412475-412480
- Chen, Q; Zhu, C; Thouas, G. (2012). Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials*, 1, pp. 2-23
- Chung, H; Park, T. (2007). Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, pp. 249-262
- Costa-Pinto, A; Ph, D; Reis, R; Neves, N. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Engineering: Part B*, 17, pp. 331-348
- Dahlin, R; Kasper, K; Mikos, A. (2011). Polymeric nanofibers in tissue engineering. *Tissue Engineering: Part B*, 17, pp. 349-364
- Dhandayuthapani, B; Yoshida, Y; Maekawa, T; Kumar, D. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science*, 2011, pp. 290602-290620
- Dimitriou, R; Jones, E; McGonagle, D; Giannoudis, P. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9, pp. 66-75
- Duan, B; Wang, M; Zhou, W; Cheung, W; Li, Z; Lu, W. (2010). Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 6, pp. 4495-4505
- Dunne, W. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15, pp. 155-166
- Fuan, J; Bi, L; Jin, D; Wei, K; Chen, B; Zhang, Z; Pei, G. (2014). Microsurgical techniques used to construct the vascularized and neurotized tissue engineering bone, *BioMed Research International*, 2014, pp. 281872-281878
- Garg, T; Singh, O; Arora, S; Murthy, R. (2012). Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 29, pp. 1-63

- Goldstein, A; Juarez, T; Gustin, M; Mikos, A. (2001). Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22, pp. 1279-1288
- Goodman, S; PhD, M; Yao, Z; PhD, M; Keeney, M; Yang, F. (2013). The future of biologic coatings for orthopedics implants. *Biomaterials*, 34, pp. 3174-3183
- Guillemin, G; Meunier, A; Dallant, P; Christel, J. (1989). Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *Journal of Biomedical Materials Research*, 23, pp. 765-779
- Guzmán, R; Nadercchia, S; Gutiérrez, M; Ferrer, M; Ramos, V; Monte, F; Abarrategi, A; López-Lacomba, J. (2014). Chitosan scaffolds containing calcium phosphate salts and rhBMP-2: *in vitro* and *in vivo* testing for bone tissue regeneration. *Plos One*, 9, pp.e87149-e87158
- Hannouche, D; Petite, H; Sedel, L. (2001). Current trends in the enhancement of fracture healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 83, pp. 157-164
- Hanson, S; Lalor, P; Niemi, S; Northup, S; Ratner, B; Spector, M; Vale, B; Willson, J. (2004). Testing biomaterials. *In: Ratner, B; Hoffman, A; Schoen, F; Lemons, J. (Eds.) Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, pp. 215-242
- Hardy, R; Cooper, M. (2009). Bone loss in inflammatory disorders. *Journal of Endocrinology*, 201, pp. 309-320
- Harris, L; Kim, B; Mooney, D. (1998). Open pore biodegradable matrices formed with gas forming. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42, pp. 396-402
- Hench, L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74, pp. 1487-1510
- Hench, L. (1980). Biomaterials. *Science*, 208, pp. 826-831
- Hench, L; Polak, J. (2002). Third generation biomedical materials. *Science*, 295, pp. 1014-1017

- Hench, L; Thompson, I. (2010). Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, pp. S379-S391
- Hench, L; Wilson, J. (1984). Surface active biomaterials. *Science*, 226, pp. 630-636
- Hetrick, E; Schoenfish, M. (2006). Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*, 35, 780-789
- Huang, Y; Kaigler, D; Rice, K; Krebsbach, P; Mooney, D. (2005). Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20, pp. 848-857
- Huebsch, N; Mooney, D. (2009). Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, 462, pp. 426-432
- Hughes, F; Turner, W; Belibasakis, G; Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41, pp. 48-72
- Hull, C. (1986). Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. *United States Patent*, 4573530, pp. 1-16
- Hurugan, R; Ramakrishna, S. (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, 65, pp. 2385-2406
- Hutmacher, D. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, pp. 2529-2543
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 3, pp. 589-601
- Jayaraman, K; Kotaki, M; Zhang, Y; Mo, X; Ramakrishna, S. (2004). Recent advances in polymer nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4, pp. 52-65
- Jaklenec, A; Hinckfuss, A; Bilgen, B; Ciombor, D; Aaron, R; Mathiowitz, E. (2008). Sequential release of bioactive IGF-1 and TGF- $\beta$  from plga microsphere-based scaffolds. *Biomaterials*, 29, pp. 1518-1525
- Kanayama, I; Miyaji, H; Takita, H; Nishida, E; Tsuji, M; Fugetsu, B; Sun, L; Inoue, K; Ibara, A; Akasaka, T; Sugaya, T; Kawanami, M. (2014). Comparative study of

bioactivity of collagen scaffolds coated with graphene oxide and reduce graphene oxide. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 3363-3373

Kathuria, Y. (1999). Microstructuring by selective laser sintering of metallic powder. *Surface and Coatings Technology*, 116, pp. 643-647

Kim, J; Yaszenski, M; Lu, L. (2009). Three-dimensional porous biodegradable polymeric scaffolds fabricated with biodegradable hydrogel porogens. *Tissue Engineering: Part C*, 15, pp. 583-594

Kirschner, C; Anseth, K. (2013). Hydrogels in healthcare: from static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia*, 61, pp. 931-944

Jin, L; Wang, T; Feng, Z; Zhu, M; Leach, M; Naim, Y; Jiang, Q. (2012). Fabrication and characterization of a novel fluffy poly pyrrole fibrous scaffold designed for 3D cell culture. *Journal of Materials Chemistry*, 22, pp. 18321-18326

Langer, R; Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, pp. 920-926

Lee, K; Mooney, D. (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101, pp. 1869-1877

Liu, X; Ma, P. (2004). Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, pp. 477-486

Luu, Y; Pessin, J; Judex, S; Rubin, J; Rubin, C. (2009). Mechanical signals as a non-invasive means to influence mesenchymal stem cell fate, promoting bone and suppressing the fat phenotype. *Bonekey Osteovision*, 6, pp. 132-149

Makhaik, P. (2013). A potential approach of scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *The Pharma Innovation*, 2, pp. 19-25

Mano, J; Sousa, R; Boesel, L; Neves, N; Reis, R. (2004). Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Composite Science and Technology*, 64, 789-817

Ma, P; Zhang, R. (1999). Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46, pp. 60-72

- Martínez-Pérez, C; Olivas-Armendariz, I; Castro-Carmona, J; García-Casillas, P. (2011). Scaffolds for tissue engineering via thermally induced phase separation. *In: Wislet-Gendebien, S. (Ed.). Advance in Regenerative Medicine*, InTech, pp. 276-294
- Martin, I; Wendt, D; Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 22, pp. 80-86
- Matassi, F; Botti, A; Sirleo, L; Carulli, C; Innocenti, M. (2013). Porous metal for orthopedics implants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 10, pp. 111-115
- Melchels, F; Feijen, J; Grijpma, D. (2010). A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*, 31, pp. 6121-6130
- Mikos, A; Temenoff, J. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, pp. 114-119
- Mikos, A; Thorsen, A; Czerwonka, L; Bao, Y; Langer, R; Winslow, D; Vacanti, J. (1994). Preparation and characterization of poly (l-lactic acid) foams. *Polymer*, 35, pp. 1068-1077
- Mironov, V; Boland, T; Trusk, T; Forgacs, G; Markwald, R. (2003). Organ printing: computer aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 21, pp. 157-159
- Mouriño, V; Boccaccini, A. (2010). Bone engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, pp. 209-227
- Musumeci, G; Castrogiovanni, P; Leonardi, R; Trovato, F; Szychlinska, M; Di Giunta, A; Loreto, C; Castorina, S. (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: a contemporary review. *World Journal of Orthopedics*, 5, pp. 80-88
- Navarro, M; Michiardi, A; Castaño, O; Planell, J. (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface*, 5, pp. 1137-1158
- Nazarov, R; Jin, H; Kaplan, D. (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk protein fibroin. *Biomacromolecules*, 5, pp. 718-726

- Nukavarapu, S; Kumbar, S; Brown, J; Krogman, N; Weikel, A; Hindenlang, M; Nair, L; Allcock, H; Laurencin, C. (2008). Polyphosphazene/nano-hidroxyapatite composite microsphere scaffolds for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 9, pp. 1818-1825
- Oliveira, C; Nascimento, M; Junior, E; Crusoé, M; Bahia, P; Rosa, F. (2010). Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 9, pp. 28-36
- Peppo, G; Palmquists, A; Borchardt, P; Lenneras, M; Hyllner, J; Sinis, A; Lausmaa, J; Thomsen, P; Karlsson, C. (2012). Free-form-fabricated commercially pure Ti e Ti6Al4V porous scaffolds support the growth of human embryonic stem cell-derived mesodermal progenitors. *The Scientific World Journal*, 2012, pp. 646417-646430
- Pham, Q; Sharma, U; Ph, D; Mikos, A. (2006). Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering*, 12, pp. 1197-1211
- Polak, D. (2010). Regenerative medicine. opportunities and challenges: a brief overview. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, pp. S777-S781
- Polo-Corrales, L; Latorre-Esteves, M; Ramirez-Vick, J. (2014). Scaffold design for bone regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14, pp. 15-56
- Porter, J; Ruckh, T; Popat, K. (2009). Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*, 25, pp. 1539-1560
- Quiao, B; Li, J; Zhu, Q; Guo, S; Qui, X; Li, W; Wu, J; Liu, Y; Jiang, D; (2014). Bone plate composed of a ternary nano-hydroxyapatite/poliamide 66/glass fiber composite: biomechanical properties and biocompatibility. *International Journal of Nanomedicine*, 2014, pp. 1423-1432
- Rajagopal, K; Schneider, J. (2004). Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, pp. 480-486
- Ratner, B. (2004). Biomaterials science: an interdisciplinary endeavour. *In: Ratner, B; Hoffman, A; Schoen, F; Lemons, J. (Eds.) Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, pp. 1-9

Rezwan, K; Chen, Q; Blaker, J; Boccaccini, A. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27, pp. 3413-3431

Ringe, J; Sitter, M. (2009). Tissue engineering in the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy*, 11, pp. 211-221

Roberts, T; Rosenbaum, A. (2012). Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis*, 8, pp. 114-124

Rodrigues, L. (2013). Aplicações de biomateriais em ortopedia. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 9, pp. 63-76

Romagnoli, C; Brandi, M. (2014). Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World Journal of Stem Cells*, 6, pp. 144-152

Romagnoli, C; D'Asta, F; Brandi, M. (2013). Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clinical cases in Mineral and Bone Metabolism*, 10, pp. 155-161

Sachs, E; Cima, M; Williams, P; Brancazio, D; Cornie, J. (1992). Three-dimensional printing: rapid tooling and prototypes directly from cad model. *Journal of Engineering for Industry*, 114, pp. 481-488

Salgado, A; Coutinho, O; Reis, R. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4, pp. 743-765

Samitsu, S; Zhang, R; Peng, X; Krishnan, M; Fuji, Y, Ichinose, I. (2013). Flash freezing route to mesoporous polymer nanofibre networks. *Nature Communications*, 4, pp. 1-7

Selimović, S; Oh, J; Bae, H; Dokmeci, M; Khademhosseini, A. (2012). Microscale strategies for generating cells-encapsulating hydrogels. *Polymers*, 4, pp. 1554-1579

Shamblott, M; Axelman, J; Wang, S; Bugg, E; Littlefield, J; Donovan, P; Blumenthal, P; Huggins, G; Gearhart, J. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured

human primordial germ cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States*, 95, pp. 13726-13731

Sharma, S; Srivastana, D; Grover, S; Sharma, V. (2014). Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8, pp. 309-315

Sikavitsas, V; Bancroft, G; Mikos, A. (2002). Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, pp. 136-148

Slaughter, B; Khurshid, S; Fisher, O; Khademhosseini, A; Peppas, N. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*, 21, pp. 3307-3329

Smith, L; Liu, X; Ma, P. (2008). Tissue engineering with nano-fibrous scaffolds. *Soft Matter*, 4, pp. 2144-2149

Smith, L; Ma, P. (2004). Nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 39, pp. 125-131

Solheim, E. (1998). Growth factors in bone. *International Orthopaedics*, 22, pp. 410-416

Stevens, M. (2008). Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*, 11, pp. 18-25

Stiehler, M; Bunger, C; Bratrump, A; Lind, M; Kassem, M; Mygind, T. (2009). Effect of dynamic 3-D culture on proliferation, distribution, and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 89, pp. 96-107

Sultana, N; Wang, M. (2011). PHBV tissue engineering scaffolds fabricated via emulsion freezing/free-drying: effects of processing parameters. *International Proceedings of chemical, biological and environmental engineering*, 19, pp. 29-34

Tabata, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, 6, pp. S311-S324

Tanaka, Y; Sung, K; Tsutsumi, A; Ohbas, S; Ueda, K; Morrison, W. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plastic and Reconstructive Surgery*, 112, pp. 1636-1644

Tan, H; Marra, K. (2010). Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials*, 3, pp. 1746-1767

Tan, S; Zhang, B; Zhu, X; Ao, P; Guo, H; Yi, W; Zhou, G. (2014). Deregulation of bone forming cells in bone diseases and anabolic effects of strontium-containing agents and biomaterials. *Biomed Research International*, 2014, pp. 814057-814068

Tarafder, S; Balla, V; Davies, N; Bandyopadhyay, A; Bose, S. (2012). Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*, 7, pp. 631-641

Thompson, J; Itskovitz-Eldor, J; Shapiro, S; Waknitz, M; Swiergiel, J; Marshall, V; Jones, J. (1998). Embryonic stem lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, pp. 1145-1147

Vagaská, B; Bacáková, L; Filová, E; Balík, K. (2010). Osteogenic cells on bio-inspired materials for bone tissue engineering. *Physiological Research*, 59, pp. 309-322

van de Belt, H; Neut, D; Schenk, W; van Horn, J; van der Mei, H; Busscher, H. (2001). Infection of orthopaedic implants and the use of antibiotic loaded bone cements. a review. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 72, pp. 557-571

Vasita, R; Katti, D. (2006). Nanofibers and their applications in tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 1, pp. 15-30

Wang, H; Ph, D; Leeuwenburgh, S; Li, Y; Jansen, J. (2012). The use of micro and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration. *Tissue Engineering: Part B*, 18, pp. 24-39

Wang, W; Ouyang, Y; Poh, C. (2011). Orthopaedic implant technology: biomaterials from past to future. *Annals Academy of Medicine Singapore*, 40, pp. 237-244

- Ward, J; Peppas, N. (2000). Kinetic gelation modeling of controlled radical polymerizations. *Macromolecules*, 33, pp. 5137-5142
- Williams, D; Black, J; Doherty, P. (1992). Second consensus conference on definitions in biomaterials. *In: Doherty, P; Williams, R; Williams; Lee, A. (Eds.) Advances in biomaterials: biomaterials-tissue interactions*, Elsevier, pp. 525-533
- Williams, D. (1987). Definitions in biomaterials. *In: Williams, D. (Ed.) Progress in Biomedical Engineering*, Elsevier, pp. 54-59
- Williams, D. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, pp. 2941-2953
- Woolf, A; Pfleger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81, pp. 646-656
- Wu, S; Liu, X; Hu, T; Chu, P; Ho, J; Chan, Y; Yeung, K; Chu, C; Hung, T; Huo, K; Chung, C; Lu, W; Cheung, K; Luk, K. (2008). A biomimetic hierarchical *scaffold*: natural growth of nanotitanates on three-dimensional microporous ti-based metals. *Nano Letters*, 8, pp. 3803-3808
- Yang, S; Ph, D; Leong, K; Du, Z; Chua, C. (2002). The design of scaffolds in tissue engineering. part II. rapid prototyping techniques. *Tissue Engineering*, 8, pp. 1-11
- Yang, S; Ph, D; Leong, K; Du, Z; Chua, C. (2001). The design of scaffolds in tissue engineering. part I. traditional factors. *Tissue Engineering*, 7, pp. 679-689
- Yannas, I. (2004). Classes of materials used in medicine: natural materials. *In: Ratner, B; Hoffman, A; Schoen, F; Lemons, J. (Eds.) Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, pp. 127-136
- Yeh, J; Ling, Y; Karp, J; Gantz, J; Chandawarkar, A; Eng, G; Blumbling, J; Langer, R; Khademhosseini, A. (2006). Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. *Biomaterials*, 27, pp. 5391-5398
- Yun, H; Park, E; Jim, J. (2014). Novel process to fabricate 3D porous calcium phosphate scaffolds at room temperature. *Biomaterials Research*, 18, pp. 1-7

Zein, I; Hutmacher, D; Tan, K; Teoh, S. (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23, pp. 1169-1185

Zhang, S. (2003). Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, 21, pp. 1171-1178

Zhang, Z; Hu, J; Ma, P. (2012). Nanofiber-based delivery of bioactive agents and stem cells to bone sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, pp. 1129-1141