

ESTUDO PILOTO DO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS IDEIAIS DE BIOMATERIAL INERENTES A ENGENHARIA TECIDUAL

J. A. P Setti*, L. F. M. Sak**

*Professor do Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Biomédica- UTFPR, Curitiba, Brasil.

** Mestrando do Programa de Mestrado Profissional em Engenharia Biomédica- UTFPR, Curitiba, Brasil.

E-mail: luizfsak@yahoo.com.br

Resumo: Este trabalho descreve a eficiência dos métodos de avaliação sob Microscopia Eletrônica de Varredura, com magnificações de 200, 500, 10.000, 20.000 e 40.000 vezes e Perfilometria 3D sem contato com lente de aumento de 50 vezes da porosidade de um biomaterial comercializado no mercado brasileiro, visando provar a qualidade do método de medição e as características do biomaterial como um candidato a arcabouço tridimensional em engenharia tecidual. O método de avaliação sob MEV se mostra eficaz e sua aplicação no estágio pré-pesquisas in-vitro e in-vivo, evitando gastos desnecessários, animais sacrificados e mão de obra desperdiçada, enfatizando assim a ética e responsabilidade profissional em pesquisas científicas. Já a PSC se mostra ineficaz para a análise deste tipo de superfície, necessitando mais estudos para sua aplicação em Engenharia Tecidual.

Palavras-chave: Células-tronco Mesenquimais, Engenharia Tecidual, Arcabouços tridimensionais, Biomateriais.

Abstract: *This paper describes the efficiency of the methods of evaluation under scanning electron microscopy with magnifications of 200, 500, 10,000, 20,000 and 40,000 times and 3D non-contact profilometer with magnifying glass 50 times the porosity of a biomaterial sold in the Brazilian market, order to prove the quality of the measurement method and the characteristics of the biomaterial as a candidate tridimensional scaffold in tissue engineering. The evaluation method proves to be effective under SEM and its application to stage in-vitro pre-and in-vivo studies, avoiding unnecessary expenses, sacrificed animals and manpower wasted thus emphasizing ethics and professional responsibility in scientific research. PSC already has proven ineffective for the analysis of this type of surface, requiring further studies for its application in Tissue Engineering.*

Keywords: *Mesenchymal Stem Cells, Tissue Engineering, three-dimensional scaffolds, Biomaterials.*

Introdução

As pessoas que sofrem com tecidos perdidos devido à doença, cirurgia ou trauma são a motivação para os inúmeros estudos de tratamentos regenerativos pela

Medicina e pela Odontologia [1]. Tendo como objetivo primordial de aliviar a dor, restaurar mecanicamente a estabilidade e sua função dos tecidos [2]. As alternativas utilizadas para a reparação como próteses artificiais não repararam completamente o tecido e a função do órgão, além de poder se desgastar e induzir uma resposta inflamatória no hospedeiro, requerendo trocas e gerando gastos adicionais ao longo dos anos [1].

Devido às limitações encontradas em recompor estes tecidos, como os métodos cirúrgicos de enxertos, o desenvolvimento de novos biomateriais com as mesmas características de um padrão-ouro, como o enxerto autólogo, faz-se necessário. Espera-se que a interação entre os campos da engenharia, biologia e ciências médicas, somados ao estudo de células tronco, venha direcionar as mudanças na área de engenharia tecidual [2].

Neste contexto as terapias celulares envolvendo Células-tronco mesenquimais estão sendo muito estudadas na atualidade, isto devido a sua capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem em vários outros tipos celulares. Mas para que o sucesso na bioengenharia seja eficaz é necessária à presença de três fatores: as próprias células-tronco, uma matriz extracelular e fatores de crescimento, sendo necessário o estudo dos dispositivos carreadores (arcabouços), que dará suporte ao seu desenvolvimento, transporte e nutrição.

Revisão de literatura

A engenharia tecidual é um campo de estudo multidisciplinar que abrange diversas áreas do conhecimento humano e tem por objetivo combinar as ciências das engenharias no intuito de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem a função de diferentes tecidos [3]. Dentre os disponíveis na atualidade podemos citar: os enxertos autólogos, homólogos, heterólogos e os aloplásticos (sintéticos).

A literatura científica descreve enxerto ósseo autólogo como o padrão-ouro para a reconstrução óssea. Porém existem desvantagens importantes como a cirurgia adicional no sítio doador, chances de aumentar a morbidade, o tempo de internação, o risco de infecção e também o custo [4], aumento do tempo e custo operatório, dor importante durante a deambulação com

média de 15 a 30 dias, possibilidade de defeito estético na região doadora e reabsorção óssea imprevisível [5].

Os enxertos ósseos alogênicos são mais utilizados como alternativas aos autógenos, mas existem desvantagens relacionadas ao aumento do risco de transmissão de doenças, rejeição e reabsorção [4]. Outra desvantagem de osso alogênico é que ele não fornece células viáveis para a primeira fase da osteogênese, pois as mesmas são destruídas durante o processamento desse material para reduzir sua imunogenicidade com o hospedeiro, assim como o heterólogo [6].

Devido à disponibilidade limitada e complicações associadas aos enxertos, pesquisadores estudam para encontrar substitutos sintéticos (biomateriais) adequados para recompor tecidos perdidos. Somados a eles a Engenharia Tecidual no estudo dos componentes biológicos que farão parte do processo de reparo. Podemos dividir as estratégias empregadas na engenharia tecidual em três grupos: o transplante celular, o condutor, e o indutor [3].

No que diz respeito ao transplante celular, podemos citar as células-tronco mesenquimais como objeto de estudo para somar no desenvolvimento do Biomaterial ideal em regeneração tecidual.

Recentemente uma nova população de células-tronco mesenquimais foi encontrada e isolada da polpa de dentes decíduos humanos esfoliados SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth) [2]-[7]-[8]. Existem dados de que estas células-tronco possuem características similares àquelas encontradas no cordão umbilical [8]. Dentre todas as vantagens quando comparadas às células-tronco da medula óssea e a SHED destacam-se o seu fácil acesso e também a ausência de conflitos éticos [7]-[8] e apresentam uma maior taxa de proliferação [8]. Estudos indicam que as SHEDs possuem habilidade de se diferenciarem em células odontoblásticas, adipócitos e células neurais [8], constituindo em fonte viável de recursos para se tornar objeto de estudo em engenharia tecidual.

A utilização de células-tronco em engenharia tecidual é promissora, porém, suas propriedades são completamente dependentes da presença de um arcabouço mecânico que dê suporte ao crescimento celular e permita a difusão dos nutrientes [9]. Os arcabouços participam de forma decisiva no processo de reparação tecidual e por isso devem ter propriedades físico-químicas adequadas [10].

A estratégia de transplante celular reflete a multidisciplinaridade da engenharia tecidual, já que requerem o cirurgião, o bioengenheiro e o histologista. O cirurgião é necessário para realizar a cirurgia de retirada do tecido onde contenha as células de interesse e para transplantar o tecido ao término de todo o estudo. Princípios de histologia são necessários para multiplicar células em laboratório e mantendo suas funções. Enquanto isso, o bioengenheiro produz tecido, e materiais para os transportes celulares [3].

A partir do transplante celular podemos dizer que o princípio essencial da engenharia tecidual é combinar, in vitro, o crescimento de células em substratos

(arcabouços) específicos, para repor ou recompor determinado tecido. Dessa forma, os tipos celulares escolhidos são críticos para o sucesso da engenharia tecidual. Atualmente às células-tronco possuem propriedades essenciais como a capacidade de se multiplicarem inúmeras vezes de forma idêntica e a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares [2].

A condução utiliza os biomateriais de uma maneira passiva, para facilitar o crescimento ou a capacidade regenerativa dos tecidos existentes [3]. E para a engenharia tecidual, uma matriz é essencial, pois fornece o arcabouço necessário para levar os nutrientes, oxigênio e retirar resíduos metabólicos. Esse arcabouço deve ser resistente, não irritante e biocompatível. Esta matriz pode ser composta por materiais sintéticos ou naturais. Os componentes da matriz podem funcionar ativando morfogenes das células implantadas enquanto esta sendo gradualmente degradada e substituída pelo tecido regenerado [8].

Moroz et. al 2009 [9] relata que quando as células-tronco são cultivadas em monocamadas, as células tendem a aderir ao fundo do recipiente, e passam por um processo de desdiferenciação, onde adquirem características morfológicas e passam a produzir componentes de matriz de outro tipo celular, perdendo a funcionalidade do tecido.

Com exceção das células sanguíneas, a maioria das células normais em tecidos humanos são residentes em uma matriz sólida chamado matriz extracelular (MEC). Existem inúmeros tipos de MEC em tecidos humanos com múltiplos componentes e composição específica a cada tipo de tecido [11].

O Arcabouço é um substrato tridimensional que fornece uma estrutura e suporte inicial para as células se anexarem, proliferarem, diferenciarem e formarem uma matriz extracelular que serve como um modelo para a regeneração do tecido, sendo que o mesmo deve ter uma superfície química e microestruturas adequadas para facilitar a adesão, proliferação e diferenciação celular [12].

Dentre as características ideais podemos citar a permeabilidade, a porosidade, estabilidade mecânica e a capacidade de degradarem-se sem quaisquer subprodutos indesejáveis, de maneira que o tecido regenerado assuma suas funções. Além disso, suas características arquiteturais em escala macro e micro (aproximadamente 100 micra) devem criar um ambiente celular que preserve a estabilidade fenotípica das células [13].

Para C. Liu em 2007 um arcabouço ideal deve ter características ideais como uma extensa rede de poros interconectados de modo que as células possam migrar multiplicar e anexar profundamente, canais através dos quais oxigênio e nutrientes são fornecidos às células em toda profundidade do arcabouço e os resíduos possam ser facilmente removidos, biocompatibilidade para as células se anexar e proliferar, forma como desejado pelo cirurgião, resistência mecânica e taxa de biodegradação adequadas [14].

A indução envolve a ativação das células nas proximidades do local a ser recomposto com específicos sinais biológicos. A origem desse mecanismo tem suas raízes na descoberta das proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) por M. R Urist em 1965, quando demonstraram que um novo osso poderia ser formado por um campo não mineralizado após implantação de osso desmineralizado. Nesse osso havia proteínas (BMPs), as quais se tornaram a chave para a indução da formação óssea [15].

O uso integrado dos materiais indutores, somado ao transplante celular se torna bem atraente. Essa estratégia envolve o transplante direto de células, cujo crescimento se deu em laboratório sobre arcabouços e após o transplante, o material que serve de substrato para o transporte das células pode degradar-se ou remodelar-se, resultando em um tecido novo restaurado [3].

Materiais biocompatíveis como os metais e as cerâmicas contribuíram significativamente no campo médico no século XX, principalmente para a reposição e tratamento dos ossos. Porém, as cerâmicas não são biodegradáveis completamente e os metais são desprovidos da capacidade de biodegradação, limitando o seu uso em engenharia tecidual. Já os polímeros têm recebido grande atenção devido ao seu amplo uso em engenharia, pelos controles em seu processo de fabricação e capacidade de serem degradáveis por completo. Os polímeros sintéticos biodegradáveis incluem os poliésteres, os policarbonatos, os polifumaratos e os policaproláticos [9]-[11].

Os poliésteres como o ácido poliglicólico (PGA), o ácido polilático (PLA) e o copolímero dos ácidos polilático e poliglicólico (PGLA) são comumente usados em engenharia tecidual [10].

Objetivos

Objetivo geral

Analisar se o método de avaliação a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura e sob Perfilometria 3D sem contato a estrutura superficial do biomaterial sintético a base de Hidroxiapatita no que se refere às características macro e microestruturais em escalas a partir do nível nanômetro/milímetro, sendo que estas características podem ajudar a determinar o quão bem o andaime cumpre funções mecânicas e biológicas, para assim candidatá-lo ou não como objeto de estudo na área de arcabouços tridimensionais em engenharia tecidual. Indicação esta, não fornecida pelo fabricante.

Objetivos específicos

Analisar o biomaterial sob: 1- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): a) O tamanho e orientação dos poros; b) Tamanho médio dos poros numa escala macro e micrométrica, c) Presença de interconexões entre os poros. 2- Perfilometria 3D sem contato (PSC): a) A densidade da distribuição dos poros; b) Perfil de rugosidade do material.

Materiais e métodos

Em ambiente livre de contaminação, poeira e umidade, foram selecionadas duas amostras do biomaterial em bloco com tamanho de 05mm³.

Foi avaliada uma superfície de cada bloco, totalizando duas faces do material, com o objetivo de avaliar n=02 superfícies na mesma medição.

A metalização foi feita em Ouro no Metalizador Q150R ES da fabricante Quorum por 8 segundos sob vácuo, para a análise foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura EVO MAS 15, da fabricante ZEISS com tensão EHT de 20.000 kV, distancia de trabalho WD de 11.0 mm, sob baixo vácuo e em magnificações de 200, 500, 10.000, 20.000 e 40.000 vezes sob temperatura ambiente de 18°+ - 1. Um exemplo pode ser observado na fig. 1.

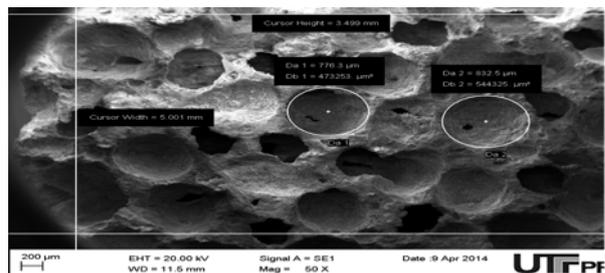


Figura 1 - Mostra o resultado da análise sob MEV com magnificação de 500 vezes do biomaterial e a medição de seus macroporos.

Os dados da superfície foi avaliada também pela medição de parâmetros de rugosidade 3D, realizadas empregando um Perfilômetro sem contato 3D Talysurf CCI – Lite (Taylor Hobson) do Laboratório de Metrologia e Qualidade da UTFPR usando uma ampliação ótica de 05x, a investigação experimental compreendeu um total de duas medições, sob temperatura ambiente de 19,7° C.

Resultados e discussão

A microscopia eletrônica tem sido uma ferramenta de trabalho utilizada pelos pesquisadores em várias áreas de estudo, pois ela abrange um conjunto de técnicas que possibilitam a caracterização da morfologia do material, composição química e determinação da estrutura atômica, tanto de metais, cerâmicas e polímeros, como de espécimes biológicas.[16]

Sob uma imagem com ampliação de 500 vezes do MEV em nosso objeto de estudo podemos observar a conformação dos macroporos na forma circular e constante em toda a superfície da amostra, também quando avaliada uma área de 17,5mm² aleatoriamente selecionada das amostras mostra que a quantidade de oito poros e seus diâmetros variados, sendo calculado seu diâmetro a partir do software da própria fabricante ZEISS conforme a fig. 1. Foi observado também a presença de interconexões entre os poros em 50% dos mesmos e quando avaliada o tamanho dos poros em uma escala micrométrica, observamos valores próximos aos relatados em literatura.[14]

Os resultados nos mostram um tamanho médio dos poros da amostra 1 de 0,437+/-0,119mm² e de 0,433+/-0,065mm² para a amostra 2, nos mostrando resultados favoráveis, Fig. 2. Sendo que Liu et. al (2007) relata

valores ideais para a avaliação microporos/macro de um biomaterial em bioengenharia varia entre 100µm à 1mm respectivamente [14]. Vassilis Karageorgiou em 2005 relata requisitos mínimos para o tamanho de poro a ser considerado ~ 100 µm, devido ao tamanho da célula, migração e de transporte. No entanto, tamanhos de poro > 300 µm são recomendadas devido ao aumento da formação de novo tecido ósseo e a formação de capilares em seu interior [17].

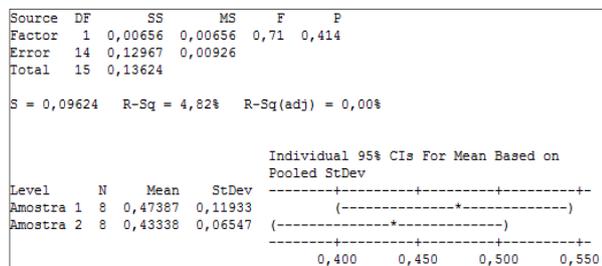


Figura 2 - Mostra a análise de variância das médias com 95% de intervalo de confiança.

A porosidade, o tamanho dos poros e a forma e a interligação dos poros é muito importante, já que desempenha um papel importante na promoção da migração celular, a ponte celular, vascularização e crescimento interno de tecido novo [18].

Outros estudos sugerem a porosimetria por intrusão de mercúrio em arcabouços 3D, mas o estudo pode se tornar mais oneroso [19].

Para uma correta interpretação do perfil de rugosidade do material a partir da análise da Perfilômetria 3D sem contato e obter dados confiáveis com as medições realizadas, será necessário um novo estudo para descobrir o motivo da imperfeição das medições e a grande quantidade de “ruídos”, tal fato pode ser explicado devido à irregularidade tridimensional da superfície do material ultrapassar a faixa de medição do Perfilômetro sem contato 3D Talysurf CCI – Lite (Taylor Hobson).

Portanto faz-se necessário mais estudos junto ao equipamento/Biomaterial.

Conclusão

Sob as análises do MEV o biomaterial estudado fornece dados iniciais importantes como o tamanho médio dos macro e microporos, sua interconectividade de poros, caracterizando assim a permeabilidade do biomaterial, confirmando a compatibilidade do mesmo com o padrão-ouro relatado em literatura. A avaliação com MEV parece ser uma proposta de avaliação inicial eficaz sua aplicação no estágio pré-pesquisas in-vitro e in-vivo, evitando gastos desnecessários com animais sacrificados e mão de obra desperdiçada, enfatizando assim, a ética e responsabilidade profissional em pesquisas científicas.

Quanto à análise do Perfilômetro 3D sem contato, serão necessários mais estudos e ensaios sobre a aplicabilidade do mesmo neste tipo de superfície e obtenção do perfil de rugosidade da superfície das amostras.

Para trabalhos futuros, as sugestões deixadas basearam-se nas dificuldades observadas ao longo deste tra-

balho e na necessidade de melhorar os métodos de avaliação do material selecionado tanto sob MEV quanto PSC.

Referências bibliográficas

- [1] Mrunal SC. Tissue Engineering: Challenges and Opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53: 617–620, 2000.
- [2] Cardoso GBC, de Arruda ACF. O papel das células tronco na engenharia tecidual. *Ciências & Cognição*, vol. 14 n. 3: 214-219, 2009.
- [3] Kaigler DBS, Mooney D. Tissue Engineering's Impact on Dentistry. *Journal of Dental Education*, vol. 65, n. 5, 2001.
- [4] Mohammad B, Momen-heravi F, Marjani M, Motahary P. A comparison of bone reconstruction following application of bone matrix gelatin and autogenous bone grafts to alveolar defects: An animal study. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, vol. 38, 288-292, 2010.
- [5] Zétola et al. Análise comparativa entre o enxerto alógeno e o autógeno para a reconstrução das fendas alveolares dos pacientes fissurados. 125f. Tese (Doutorado em Odontologia - opção Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFSC, Florianópolis, 2002.
- [6] Ellis E, Sinn DP. Use of Homologous Bone in Maxillofacial Surgery. *Journal Oral Maxillofacial Surgery* vol. 51 n.11, 81, 1993.
- [7] Kerkis I, Caplan AI. Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. *Tissue Engineering: Part. B*, vol. 18, n. 2, 2012.
- [8] Soares AP, Luégua AHK, de Jesus AA, de Araújo TM. Células-tronco em Odontologia. *Revista Dental Press Ortodontia e Ortopedia Facial*, v. 12, n. 1, p. 33-40, 2007.
- [9] A Moroz, Bittencourt RAC, Felisbino SL, Pereira HR, Rossi-Ferrreira R, Deffffune E. Gel de Plaquetas: arcabouço 3D para cultura celular. *Acta Ortopedia Brasileira*. vol.17, n. 2, 43-5, 2009.
- [10] Guoping C, Takashi U, Tetsuya T. Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience journal*, vol. 2, 67-77, 2002.
- [11] Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, vol. 17, 2008.
- [12] Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue, *Biomaterials*, vol. 23, 4095–4103, 2002.
- [13] Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering*. Science, vol. 6, 260-920, 1993.
- [14] Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Advances in Chemical Engineering and Science*, vol. 85, 1051–1064, 2007.
- [15] Urist MR. Bone: Formation by Autoinduction. *Science, New Series*, vol. 150, n. 3698, 893-899, 1965.
- [16] Oliveira L S A F, et. al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *R. Ci. méd. biol.* 2010; 9(Supl.1):37-44.
- [17] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, vol. 26, 5474–5491, 2005.
- [18] Viana T et al. Permeability evaluation of lay-down patterns and pore size of PCL scaffolds. *Procedia Engineering* 59 (2013) 255 – 262.
- [19] Lima P.A.L. et al. Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 3389–3395.