



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

Rita Maria Lages Nobre

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob orientação de:
Professora Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha**

2016



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

Rita Maria Lages Nobre

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**Trabalho efetuado sob orientação de:
Professora Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha**

2016

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o(a) autor(a) deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Assinatura do Autor)

Copyright Rita Nobre.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Professora Doutora Ana Margarida Grenha pela ajuda, apoio e dedicação na realização desta dissertação.

À Professora Doutora Isabel Ramalinho por todo o esforço e dedicação tanto na organização dos estágios como durante o restante ano letivo.

A todos os professores pelos ensinamentos que me transmitiram durante o percurso académico, contribuindo para a minha formação enquanto futura Farmacêutica.

À equipa dos serviços farmacêuticos do Hospital CUF Descobertas por me terem recebido e pelos conhecimentos que me transmitiram.

À equipa da Farmácia Aguiar por me ter acolhido durante os 4 meses de estágio e me ter feito sentir em família. Obrigada por todos os ensinamentos que me transmitiram e pelo excelente ambiente de estágio que me proporcionaram.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o apoio, carinho e dedicação ao longo desta grande jornada, por nunca terem duvidado das minhas capacidades e tanto terem contribuído para o meu sucesso académico. Sem eles a realização deste curso não teria sido possível.

Ao meu namorado pelo grande apoio e compreensão ao longo dos cinco anos e por nunca ter duvidado das minhas capacidades.

Aos meus restantes familiares que igualmente me apoiaram e acompanharam durante este percurso.

E um obrigado muito especial aos meus colegas de turma que foram muito mais do que isso durante estes cinco anos. Obrigada por terem feito desta etapa a melhor etapa da minha vida.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esta etapa fosse concluída, muito obrigada!

Resumo/ Abstract

RESUMO

A Engenharia de Tecidos tem vindo a ser uma área muito investigada e com grande desenvolvimento ao longo das últimas décadas. A sua evolução encontra-se aliada à existência de poucas alternativas terapêuticas para a substituição ou regeneração de funções, tecidos ou órgãos, sendo necessário o desenvolvimento de novas estratégias.

Todo o processo tem por base o desenvolvimento de tecidos novos e funcionais usando células vivas, que são geralmente associadas a estruturas de suporte (*scaffolds*), de forma a orientar o desenvolvimento do tecido. A obtenção de estruturas de suporte com características ideais tanto a nível de biocompatibilidade, biodegradabilidade, resistência mecânica, ambiente adequado para adesão, proliferação e sobrevivência celular tem vindo a ser um grande desafio.

Os hidrogéis têm demonstrado um grande potencial para aplicações biomédicas, nomeadamente a nível da regeneração de tecidos, sendo uma classe de biomateriais bastante estudada e com algumas aplicações já descritas. Estes podem ser obtidos a partir de materiais poliméricos de origem natural ou sintética, e através de processos de reticulação física ou química.

Tanto os polímeros de origem natural como os de origem sintética apresentam vantagens e desvantagens, sendo a escolha do tipo de polímero dependente da função ou órgão que se pretende substituir ou regenerar.

A vantagem dos hidrogéis comparativamente a outros tipos de materiais passíveis de serem aplicados nesta área é o facto destes apresentarem uma vasta gama de características que podem ser otimizadas através de combinação de diferentes polímeros, alterações no tipo de agentes de reticulação usados ou na densidade de reticulação, modificações de grupos funcionais ou adição de péptidos de adesão.

Nesta monografia será efetuada uma revisão relativamente ao conhecimento acerca dos hidrogéis e as perspetivas futuras, no que toca à sua potencialidade de aplicação na área da Engenharia de Tecidos.

Palavras-chave: biomateriais, engenharia de tecidos, hidrogéis, regeneração tecidular, scaffolds

ABSTRACT

Tissue Engineering has been turning into a very investigated area and with huge development in the last few decades. The evolution of this area is linked to the existence of little therapeutic alternatives to the substitution or regeneration of functions, tissues and organs, being necessary the development of new strategies.

The whole process is based on the development of functioning new tissues using living cells, which are generally associated to support structures (scaffolds), in order to guide the development of the tissue. The obtainment of support structures with ideal characteristics at the level of biocompatibility, biodegradability, mechanic resistance, adequate environment for adhesion, proliferation and cellular survival has been a huge challenge.

The hydrogels have been showing a great potential for biomedical applications, specifically at the level of the regeneration of tissues, being a class of biomaterials widely studied and with some applications already described. These might be obtained through polymeric materials of natural or synthetic origin, and through processes of physical or chemical crosslinking.

Both the polymers of natural and synthetic origin present advantages and disadvantages, being the choice for the type of polymers dependent of the function or the organ that is meant to be substituted or regenerated.

The advantage of the hydrogels comparing to other types of materials susceptible of being applied in this area consists on the fact that these present a wide range of characteristics that might be optimized through the combination of different polymers, alterations on the type of crosslinking agents used or in the density of reticulation, modifications of functioning groups or addition of adhesion peptides.

In this monography will be made a review regarding the knowledge about the hydrogels and the future standpoints, in what concerns its potentiality of application in the Tissue Engineering area.

Key-words: biomaterials, hydrogels, scaffolds, tissue engineering, tissue regeneration

Índice Geral

Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Metodologia	3
3. Engenharia de Tecidos	4
3.1. Conceito e estratégia.....	4
3.1.1. Requisitos para o desenvolvimento dos <i>Scaffolds</i>	5
4. Hidrogéis.....	7
4.1. Conceito de hidrogel, história e aplicação	7
4.2. Classificação dos hidrogéis.....	8
4.2.1. Classificação de acordo com a composição polimérica	8
4.2.2. Classificação baseada no tipo de reticulação.....	10
4.2.3. Classificação baseada na resposta a estímulos	11
5. Materiais poliméricos como biomateriais	12
5.1. Polímeros naturais.....	13
5.1.1 Polissacarídeos	13
5.1.2 Polipéptidos	15
5.2 Polímeros sintéticos	17
6. Aplicação de hidrogéis em engenharia de tecidos	21
6.1. Hidrogéis de polímeros naturais	22
6.1.1. Colagénio.....	23
6.1.2. Gelatina.....	27
6.1.3. Ácido Hialurónico	29
6.1.4. Alginato	31

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

6.1.5.	Quitosano.....	35
6.2.	Hidrogéis de polímeros sintéticos.....	41
6.2.1.	Poli (2-hidroxietil metacrilato).....	41
6.2.2.	Ácido polilático-co-glicólico.....	43
6.2.3.	Poli (etilenoglicol).....	45
6.2.4.	Álcool polivinílico.....	46
7.	Conclusão.....	49
8.	Bibliografia.....	50

Índice de Figuras

Figura 3.1-Estratégia usada em Engenharia de Tecidos.....	5
Figura 4.1-Classificação dos hidrogéis baseada nas diferentes propriedades.	8
Figura 4.2-Esquema representativo de uma Rede Polimérica Interpenetrada (IPN).....	9
Figura 4.3-Esquemas representativos de hidrogéis químicos e físicos.	11
Figura 5.1-Estrutura química do ácido hialurónico.....	14
Figura 5.2-Estrutura química da quitina e no quitosano, respetivamente.	14
Figura 5.3-Estrutura química do alginato.	15
Figura 6.1-Crescimento celular nos hidrogéis de colagénio com concentração de 5 mg/mL (CCH5), de 3 mg/mL (CCH3) e de 0.66 mg/mL (NCH).	24
Figura 6.2-Percentagem de células apoptóticas em cada um dos hidrogéis estudados. .	25
Figura 6.3-Fotografias representativas das córneas transplantadas, no grupo experimental (linha superior) e no grupo controlo (linha inferior).	26
Figura 6.4-Percentagem de massa restante em cada hidrogel ao longo dos cinquenta e seis dias de estudo.	27
Figura 6.5-Seções coradas com eosina e hematoxilina de epiderme reconstruída em scaffolds de hidrogéis de Gel-MA (A) e de hidrogéis controlo de colagénio (B), após duas semanas (i) e seis semanas (ii) de cultura. E= epiderme, S=scaffolds.	28
Figura 6.6- Atividade da LDH medida a partir de meios de cultura recolhido 24 h após a exposição das células MC3T3-E1 com hidrogéis de alginato e hidrogéis de ácido hialurónico com diferentes concentrações de polímeros (1%, 2% e 3%).	32
Figura 6.7- Atividade de fosfatase alcalina (ALP) nas células MC3T3-E1 cultivadas durante 21 dias em hidrogéis de alginato e hidrogéis de ácido hialurónico com diferentes concentrações de polímero (1, 2 e 3%)......	33
Figura 6.8- Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento de hidrogéis compostos S-CS / A-HA liofilizado. (A) - (c) morfologia de superfície de hidrogéis com a proporção em volume de 07/03 (a), 5/5 (b) e 7/3 (c). (D) - (f) morfologia transversal de hidrogéis com a proporção em volume de 07/03 (d), 5/5 (e) e 7/3 (f).....	36
Figura 6.9- Número de condrócitos bovinos aderidos à superfície dos hidrogéis comparativamente com os poços de controlo. TCP-fosfato tricálcico.	37
Figura 6.10- Imagens radiográficas dos defeitos tibiais de ratos obtidas duas semanas após o seu preenchimento com o hidrogel de Zn-CS / β -GP e o hidrogel de Zn-CS / nHAp / β -	

GP. (a) Controle, (b) hidrogel de Zn-CS / β -GP, (c) hidrogel de Zn-CS / nHAp / β -GP.39

Figura 6.11-Hidrogel compósito de PLGA-g-PEG contendo 10% de hidroxiapatite liquido a 4 °C e em forma de gel a 37 °C. 43

Figura 6.12-Imagens histológicas dos defeitos tíbias, corados com eosina e hematoxilina, sem preenchimento (controle), preenchidos com o hidrogel de PLGA-PEG-PLGA e preenchidos com hidrogel de PLGA-PEG-PLGA contendo sinvastatina (SIM/PLGA-PEG-PLGA) quatro semanas após a injeção. 44

Figura 6.13- Aparência histológica da cartilagem articular do joelho dois anos após a operação. (A) Grupo controle; (B) Grupo com menisco artificial. 1. Superfície do côndilo femoral; 2. Superfície da tibia. 47

Índice de Tabelas

Tabela 4.1- Métodos de Síntese de hidrogéis físicos e hidrogéis químicos..	10
Tabela 5.1-Polímeros naturais.	13
Tabela 5.2--Polímeros sintéticos..	17
Tabela 5.3- Propriedades físicas de poliésteres alifáticos usados como <i>scaffolds</i>	18
Tabela 6.1-Algumas aplicações de hidrogéis de polímeros naturais como <i>scaffolds</i> em engenharia de tecidos.....	22
Tabela 6.2 -Algumas aplicações de hidrogéis de polímeros sintéticos como <i>scaffolds</i> em engenharia de tecidos.....	41

Lista de Abreviaturas

A-HA: ácido hialurónico aldeído

ALP: fosfatase alcalina

EDAC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) -carbodiimida

ESB: Sociedade Europeia para os Biomateriais (do inglês European Society for Biomaterials)

HA: ácido hialurónico

IPN: Redes Poliméricas Interpenetrantes (do inglês interpenetrating networks)

LDH: lactato desidrogenase

MA: metacrilamida

nHAp: nanohidroxiapatite

PCL: policaprolactona

PEG: poli (etilenoglicol)

PGA: ácido poliglicólico

PHEMA: poli (2-hidroxietil metacrilato)

PLA: ácido polilático

PLGA: ácido (polilático-co-glicólico)

PVA: álcool polivinílico

S-CS: *N*-succinil-quitosano

TCP: fosfato tricálcico

Tg: temperatura de transição vítrea (do inglês glass transition temperature)

Zn: zinco

β -GP: β -glicerofosfato

1. Introdução

Atualmente, a nível mundial, devido a determinadas doenças ou à ocorrência de acidentes, muitas pessoas sofrem de lesão e perda de órgãos ou tecidos. Uma das terapêuticas possíveis nestes casos é a transplantação. No entanto, este procedimento apresenta diversas limitações sendo a principal a inexistência de órgãos e tecidos em número suficiente para se realizarem todos os transplantes necessários (1).

Em Portugal, por exemplo, segundo o *Instituto Português do Sangue e da Transplantação*, entre janeiro e dezembro de 2015, foram realizados 830 transplantes. No entanto, em dezembro de 2015 ainda se encontravam em lista de espera (ativa) para transplantação 2053 pessoas (2).

Devido a esta limitação tornou-se necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas. Nesse sentido surge a Engenharia de Tecidos, conceito que foi aplicado pela primeira vez por volta de 1980. A Engenharia de Tecidos tem como objetivo substituir ou regenerar tecidos lesados, tendo por base conhecimentos de biologia celular e molecular, bioquímica, biotecnologia, ciência dos materiais e engenharia (3,4). É uma área em contínua investigação e marcado desenvolvimento. Todo o processo tem por base o desenvolvimento de tecidos novos e funcionais usando células vivas, que são geralmente associadas a estruturas de suporte biodegradáveis (*scaffolds*), de forma a orientar o desenvolvimento do tecido (4).

Este processo pode ser dividido em várias etapas sendo iniciado com a realização da colheita de células, seguida da escolha e preparação do suporte (*scaffold*). Neste suporte será inoculada a cultura celular e adicionadas moléculas bioativas, fatores de crescimento e fatores de sinalização. Terminados estes passos é realizado o crescimento tecidual em ambiente controlado e posteriormente o implante cirúrgico do tecido (5).

O desenho dos *scaffolds*, verdadeiras estruturas de suporte, é um dos pontos cruciais para o sucesso da Engenharia de Tecidos, pretendendo-se o desenvolvimento de suportes biologicamente ativos, biocompatíveis e com estrutura favorável à proliferação e sobrevivência celular, de forma a mimetizar o tecido lesado (6).

Desta forma, aliado ao desenvolvimento da Engenharia de Tecidos verificou-se o desenvolvimento da área dos Biomateriais. Estes correspondem a materiais, de origem natural ou sintética, que interagem com os sistemas biológicos, podendo ser usados para fins biomédicos. Dentro deste grupo encontram-se materiais metálicos, cerâmicos,

poliméricos e compósitos (7), sendo os polímeros os materiais mais usados neste campo (8).

Englobados no grupo dos materiais poliméricos encontram-se os hidrogéis, cuja descrição surgiu por volta de 1960. São compostos por polímeros hidrófilos com uma estrutura tridimensional, em forma de rede, com grande capacidade de retenção de água, associar células e transportar biomoléculas (9,10). Tendo em conta a sua complexidade e a época em que surgiram podem ser classificados como hidrogéis de primeira, segunda ou terceira geração. Para além dessa classificação, podem ser divididos em subgrupos de acordo com algumas características que apresentem, tais como propriedades físicas, tipo de estrutura, fonte, carga iónica, método de preparação, resposta a estímulos, tipo de ligações e tipo de degradação (11).

Nesta monografia será realizada uma revisão relativamente ao conhecimento atual acerca dos hidrogéis e as perspetivas futuras, no que toca à sua potencialidade de aplicação na área da Engenharia de Tecidos. No primeiro capítulo será efetuada uma abordagem teórica da Engenharia de Tecidos, seguida de uma descrição e classificação dos hidrogéis no segundo capítulo. Posteriormente, no penúltimo capítulo será efetuada uma breve descrição dos materiais poliméricos mais frequentemente aplicados como biomateriais para produção de hidrogéis e no capítulo final serão abordadas as características específicas de alguns hidrogéis que levam à sua aplicação nesta área.

2. Metodologia

De modo a obter a informação necessária para o desenvolvimento desta monografia foram utilizadas várias fontes bibliográficas.

Inicialmente foi realizada uma pesquisa e recolha de informação em diversas bases de dados, como B-on, PubMeb, Research Gate e Google Scholar. Os termos utilizados para tal foram “hydrogels for tissue engineering”, “hydrogel scaffolds”, “polymeric biomaterials”. Esta pesquisa permitiu aceder a diversos artigos científicos quer de revisão, quer originais, revistas científicas, algumas monografias e livros online. Dos artigos obtidos na pesquisa foram considerados para estudo os que se encontravam na língua portuguesa e inglesa, com publicação realizada entre 2000 e 2016.

Para além disso, foram também consultadas algumas páginas de internet de institutos e organizações relacionadas com o tema, tais como o Instituto Português do Sangue e Transplantação, National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering e European Society for Biomaterials. Após esta recolha bibliográfica foi efetuada a seleção da informação científica, tendo em conta a atualidade e relevância da mesma. Toda a informação utilizada para o desenvolvimento da presente monografia encontra-se devidamente referenciada.

3. Engenharia de Tecidos

3.1. Conceito e estratégia

Como já referido na Introdução, a Engenharia de Tecidos corresponde a uma área multidisciplinar que tem como objetivo desenvolver substitutos biológicos, ou seja, tecidos novos e funcionais, com vista a substituir ou regenerar tecidos lesados. O conceito de Engenharia de Tecidos surgiu por volta de 1980, sendo reconhecida, segundo a *National Science Foundation*, dos Estados Unidos da América, como “A aplicação dos princípios e métodos de Engenharia e Ciências da Vida em direção à compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos de mamíferos normais e patológicos e do desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido" (12).

Desde então tem sido uma área bastante investigada, com grande desenvolvimento. Para a obtenção desses tecidos novos é usada uma estratégia que assenta em três pontos-chave. São desenvolvidos suportes biodegradáveis (*scaffolds*) que funcionam como matriz extracelular, sobre estes são semeadas células e posteriormente adicionados fatores bioquímicos, como fatores de crescimento que estimulam a proliferação e diferenciação celular (13). Em termos gerais, após escolha e preparação do suporte (*scaffold*), o processo pode ser dividido nas seguintes etapas (figura 3.1):

- i. Colheita de células
- ii. Crescimento e manipulação celular
- iii. Inoculação da cultura celular sobre o suporte e adição de moléculas bioativas, fatores de crescimento e fatores de sinalização
- iv. Crescimento tecidual em ambiente controlado
- v. Implante cirúrgico do tecido (3,14)

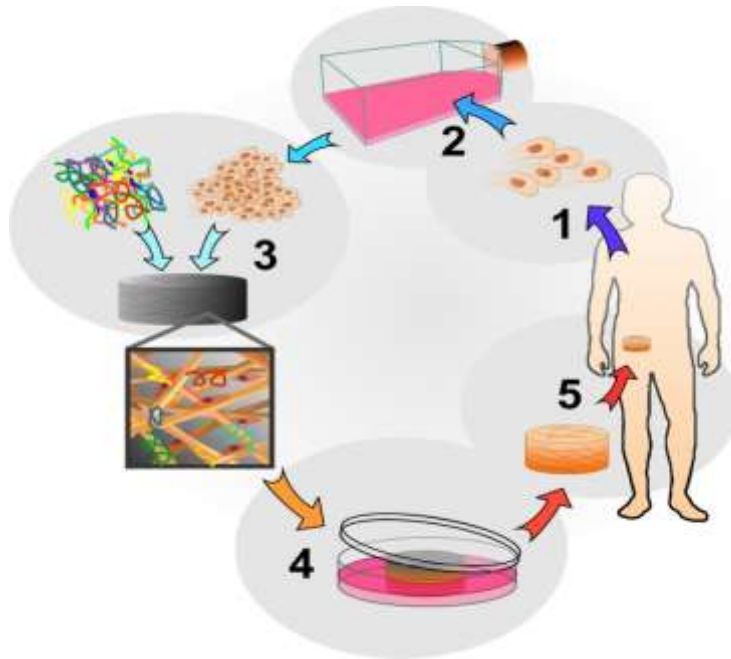


Figura 3.1-Estratégia usada em Engenharia de Tecidos. Reproduzido de (3).

Os suportes podem ser cultivados *in vitro* sendo colocados em ambiente controlado para ocorrer o crescimento tecidual e seguidamente são implantados no local da lesão, ou podem ser injetados diretamente no local, ocorrendo a indução do desenvolvimento do tecido *in vivo* (13).

3.1.1. Requisitos para o desenvolvimento dos *Scaffolds*

Um dos pontos críticos desta estratégia é a escolha e desenvolvimento dos *scaffolds*. Estes suportes devem assemelhar-se o mais possível à membrana extracelular de forma a mimetizá-la. Deste modo os *scaffolds* deverão obedecer a vários requisitos.

Estes deverão ser inócuos do ponto de vista da toxicidade, ou seja, aquando da sua implantação não deverão originar nenhuma reação adversa. Para além disso é necessário que sejam biocompatíveis de modo a desencadarem uma reação imunitária desprezável, prevenindo assim a ocorrência da sua rejeição por parte do organismo. Assim, os biomateriais usados para fabricar os suportes têm de ser compatíveis com os componentes celulares dos tecidos artificiais e as células do hospedeiro (12,15). Em termos de arquitetura os suportes deverão apresentar uma estrutura porosa, de forma a permitir a vascularização e o transporte eficiente dos nutrientes e metabolitos essenciais para a formação do novo tecido. Os poros terão que apresentar uma dimensão adequada para

possibilitar os processos acima citados e ao mesmo tempo garantir a estabilidade mecânica do suporte (15).

A sua superfície deverá apresentar uma composição química adequada à adesão, crescimento, diferenciação e proliferação das células em si aplicadas, quer em ambiente *in vitro* quer *in vivo*. Os biomateriais que constituem o suporte deverão ser biodegradáveis de modo a permitir a substituição gradual do suporte implantado por células do próprio organismo. Os suportes correspondem a implantes temporários e é pretendido que as células do organismo construam a sua própria matriz extracelular. O suporte deve apresentar propriedades mecânicas adequadas à zona corporal onde será implantado, fornecendo a estabilidade e rigidez necessária para o desenvolvimento local do tecido. Por último, os suportes deverão ser fáceis de fabricar, permitindo o seu fabrico em diferentes formas e tamanhos e a custo acessível (12,15,16).

Tendo em conta estes pontos entende-se a importância da escolha do biomaterial mais adequado.

4. Hidrogéis

4.1. Conceito de hidrogel, história e aplicação

O conceito de hidrogel, tal como o conhecemos atualmente, foi aplicado pela primeira vez em 1960 por Wichterle and Lim aquando da publicação dos resultados de um dos seus trabalhos de investigação (17). Os hidrogéis correspondem a um material polimérico hidrófilo com estrutura tridimensional, em forma de rede. Estes podem ser formados *in vitro* ou *in situ*, podendo ser implantáveis ou injetáveis (9).

De acordo com o seu nível de complexidade, os hidrogéis podem ser divididos em três gerações. A primeira geração corresponde a redes poliméricas simples obtidas a partir da formação de ligações químicas. Estas redes eram desenvolvidas com vista a serem usadas em oftalmologia ou para libertação de fármacos. Posteriormente, por volta dos anos setenta, surgiram os “hidrogéis de segunda geração”. Estes são obtidos através do estabelecimento de interações físicas (interações hidrofóbicas e iónicas) e diferem dos anteriores por apresentarem reposta às alterações do ambiente onde se encontram, ou seja, respondem a estímulos específicos. Os estímulos a que respondem podem ser de origem física, química ou bioquímica. Esta particularidade torna-se vantajosa, uma vez que permite uma aplicação em casos onde se pretende a formação do gel ou a libertação do fármaco num local muito específico (11,17).

Por último, por volta de 1990, surgiu a terceira geração de hidrogéis que corresponde a hidrogéis obtidos através de outras interações físicas. Estes podem ser obtidos por formação de complexos de inclusão (química supramolecular) e formação de complexos de coordenação metal-ligando, e foram desenvolvidos com vista a melhorar as propriedades mecânicas, térmicas e de degradação, para além da possibilidade de formação *in situ* (17).

Em termos de aplicações estes são usados nas mais diversas áreas. No campo da biomedicina começaram por ser usados no fabrico de lentes de contacto, sendo depois amplamente estudados e aplicados para a libertação controlada de fármacos e como biomateriais em Engenharia de Tecidos. Noutras áreas têm aplicações muito variadas. Por exemplo, na área da alimentação, podem ser usados como filtros de purificação de água. Podem também ser aplicados, noutros campos, como adsorventes em fraldas descartáveis,

como materiais para realização de técnicas de análise, nomeadamente, cromatografia e eletroforése, entre outras (11).

4.2. Classificação dos hidrogéis

Para além da divisão anterior, baseada em três gerações, os hidrogéis podem ser divididos em grupos de acordo com as características que apresentam. As características que permitem fazer essa classificação representam-se na figura 4.1. De seguida serão descritas algumas das classificações mais relevantes.



Figura 4.1-Classificação dos hidrogéis baseada nas diferentes propriedades. Adaptado de (18).

4.2.1. Classificação de acordo com a composição polimérica

De acordo com o método de preparação os hidrogéis são divididos em hidrogéis homopoliméricos, hidrogéis copoliméricos, redes poliméricas interpenetrantes (IPN) e redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN).

A unidade estrutural básica dos polímeros é designada de monómero. Os hidrogéis homopoliméricos correspondem a uma rede polimérica resultante da ligação de uma única espécie de monómero hidrófilo. Os hidrogéis copoliméricos são compostos por

duas ou mais espécies diferentes de monómeros com pelo menos um componente hidrófilo, dispostos numa configuração aleatória, em bloco ou alternada ao longo da cadeia da rede de polímero (19).

No caso dos hidrogéis ou redes poliméricas interpenetradas (IPN) para ocorrer a sua formação é necessária a combinação de dois ou mais polímeros em forma de rede. A formação do hidrogel ocorre por síntese ou reticulação de um dos polímeros em forma de rede na presença de outro já reticulado, sendo cada rede formada por um único tipo de polímero. Ou seja, há interpenetração das cadeias do segundo polímero com a rede do primeiro polímero obtendo-se, assim, uma rede fisicamente reticulada (20,21). Na figura 4.2 encontra-se representado um esquema de uma rede polimérica interpenetrada.

No caso das redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN) o processo de formação é semelhante no entanto um dos polímeros é reticulado e o outro é linear (20).

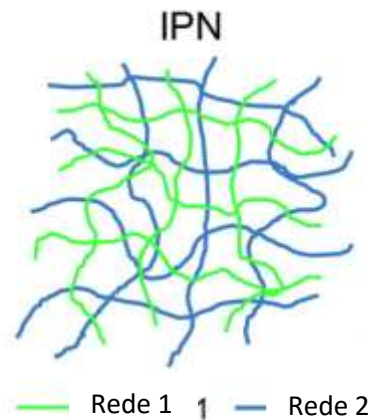


Figura 4.2-Esquema representativo de uma Rede Polimérica Interpenetrada (IPN). Reproduzido de (22).

4.2.2. Classificação baseada no tipo de reticulação

Os hidrogéis são formados através de ligações denominadas reticulações. As reticulações, como o próprio nome indica, correspondem às ligações ou interações que levam à obtenção da estrutura em forma de rede. Com base no tipo de reticulação os hidrogéis podem ser divididos em duas categorias: hidrogéis físicos e hidrogéis químicos. Os hidrogéis físicos resultam do estabelecimento de interações físicas entre as cadeias poliméricas. Estas interações físicas podem ser interações hidrofóbicas, ligações iónicas, pontes de hidrogénio, formação de complexos de inclusão (química supramolecular) e formação de complexos de coordenação metal-ligando. Contrariamente, os hidrogéis químicos são resultantes de ligações químicas, ou seja, formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas (18,23). Na tabela 4.1 encontram-se apresentadas as diferentes formas de obtenção de hidrogéis, tanto físicos como químicos.

Tabela 4.1- Métodos de Síntese de hidrogéis físicos e hidrogéis químicos. Adaptado de (23).

Hidrogéis Físicos	Hidrogéis Químicos
Interações Iónicas	Polimerização
Interações Hidrofóbicas	Radiação (raios- γ , etc.)
Interações por pontes de hidrogénio	Ligações entre moléculas
Estereocomplexação	Ligações polímero-polímero (reações de condensação, etc.)
Química Supramolecular (complexos de inclusão, etc.)	

Assim, tendo em conta estas particularidades é possível afirmar que os hidrogéis físicos são redes poliméricas com ligações reversíveis, enquanto que os hidrogéis químicos são redes poliméricas com ligações permanentes (18,24). Na figura 4.3 é possível visualizar as diferenças estruturais entre os dois tipos de redes.

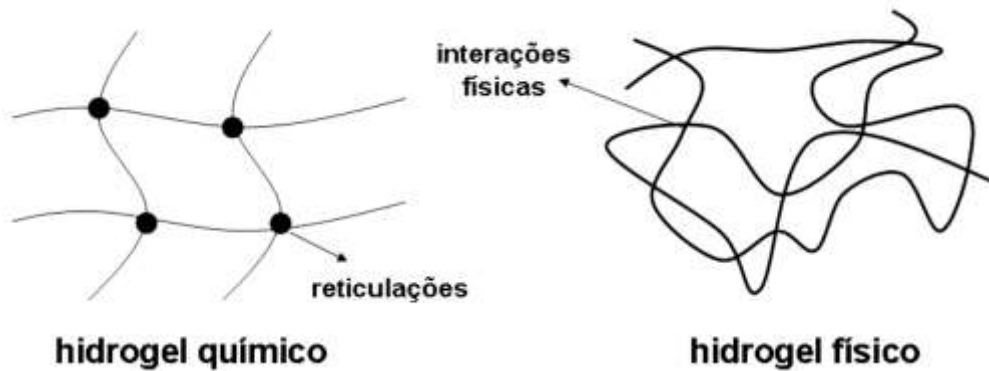


Figura 4.3-Esquemas representativos de hidrogéis químicos e físicos. Reproduzido de (24).

4.2.3. Classificação baseada na resposta a estímulos

Alguns hidrogéis podem exibir modificações em resposta a alterações no ambiente envolvente, ou seja, respondem a estímulos, os quais podem ser de origem física, química ou bioquímica. Os estímulos físicos são, por exemplo, luz, pressão, existência de campo elétrico ou de campo magnético. Entre os estímulos químicos contam-se temperatura, presença de moléculas específicas e alterações na concentração das mesmas. Por sua vez, os estímulos bioquímicos correspondem à presença de antígenos, enzimas ou ligando (18). Os hidrogéis, aquando da ocorrência destas alterações, podem responder através de mudanças a nível da retenção de água, na estrutura da rede, permeabilidade ou resistência (25).

5. Materiais poliméricos como biomateriais

Atualmente existem várias definições de biomaterial sendo a definição da Sociedade Europeia para os Biomateriais (ESB- European Society for Biomaterials) uma das mais aceites. Segundo esta sociedade um biomaterial é um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do organismo (12,26).

Dentro das aplicações dos biomateriais encontram-se, por exemplo, a produção de lentes de contacto, de próteses, materiais dentários, pensos para tratamento de feridas, encapsulação de fármacos e engenharia de tecidos, entre outros (27).

Idealmente um biomaterial deve apresentar biocompatibilidade, propriedades físicas e mecânicas adequadas, ser inerte do ponto de vista da toxicidade e ser facilmente obtido (28).

Em engenharia de tecidos podem ser usados biomateriais de vários tipos como é o caso dos polímeros, compósitos, materiais cerâmicos e metais, sendo os polímeros muito usados devido à sua versatilidade e características estruturais semelhantes às dos tecidos. Estes podem ser divididos em polímeros naturais ou polímeros sintéticos, de acordo com a sua fonte (29). Os polímeros naturais apresentam como principal vantagem o facto de serem semelhantes a constituintes orgânicos, sendo reconhecidos pelas células do hospedeiro de forma a originarem interações celulares positivas. Em termos de desvantagens os polímeros naturais possuem variabilidade entre lotes, sendo a sua composição variável de acordo com a fonte de extração e, para além disso, devido ao potencial risco de imunogenicidade, necessitam de ser submetidos a um processo de purificação antes de serem aplicados (30). Os polímeros sintéticos têm a vantagem de serem obtidos por processos químicos controláveis. Este são geralmente simples e possibilitam uma produção em grande escala, sem apresentarem variações entre lotes, e tornam possível moldar algumas características, tais como degradabilidade e propriedades mecânicas da rede formada, de acordo com as características no tecido ou função a substituir (31).

De modo a tomar partido das vantagens destes dois tipos de polímeros e a ultrapassar algumas das suas desvantagens tem vindo a ser investigado o desenvolvimento de hidrogéis compostos pelos dois tipos de polímeros (32).

5.1. Polímeros naturais

Dentro dos polímeros naturais podem distinguir-se três grupos, sendo eles os polissacarídeos, polinucleótidos e polipéptidos (tabela 5.1) (28).

Tabela 5.1-Polímeros naturais. Adaptado de (28)

Polímeros Naturais		
Polissacarídeos	Polipéptidos	Polinucleótidos
Ácido hialurónico, quitina, quitosano, dextrano, celulose, agarose, pectina e alginate	Colagénio, gelatina, elastina e fibrina	Ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA)

Em termos de carga os polímeros aniónicos correspondem ao ácido hialurónico, sulfato de dextrano, ácido algínico, pectina e sulfato de condroitina. O quitosano, por sua vez é um polímero catiónico. Os polímeros neutros são o dextrano e a agarose e são polímeros anfipáticos o colagénio, a gelatina e a fibrina. (33).

Seguidamente serão abordados alguns dos polímeros naturais com maior interesse na área biomédica.

5.1.1 Polissacarídeos

O ácido hialurónico é um glucosaminoglicano, apresentando uma estrutura linear constituída por unidades de N-acetil-D-glucosamina e ácido glucurónico (figura 5.2). É um dos componentes da matriz extracelular encontrando-se no líquido sinovial, humor vítreo, cartilagem e na pele. Este polímero pode ser aplicado topicamente ou ser injetado tendo vindo a ser usado para tratamento de osteoartrite, em cirurgia oftálmica, em cosmética e em engenharia de tecidos (34).

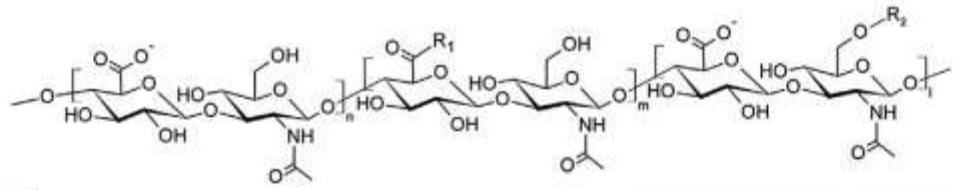


Figura 5.1-Estrutura química do ácido hialurónico. Reproduzido de (35).

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante no planeta Terra, logo a seguir à celulose, podendo ser encontrado no exosqueleto de crustáceos e insetos. Estruturalmente apresenta-se como um polissacarídeo de cadeia linear composto por unidades monoméricas de glucosamina e de N-acetil-D-glucosamina com ligação β (1 \rightarrow 4). Através da desacetilação da quitina pode ser obtido o quitosano, que apresenta maior proporção de unidades de glucosamina comparativamente à quitina (36,37). Na figura 5.3 é possível visualizar a estrutura química de ambos os polímeros.

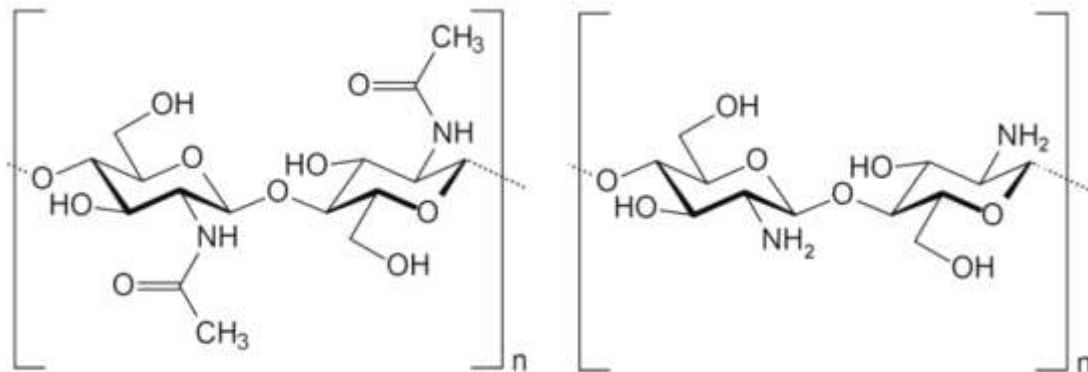


Figura 5.2-Estrutura química da quitina e no quitosano, respetivamente. Reproduzido de (38).

Na literatura, tanto a quitina como o quitosano são descritos como sendo materiais biodegradáveis, biocompatíveis, não tóxicos com atividade antimicrobiana e baixa imunogenicidade. A quitina, devido às ligações por pontes de hidrogénio que possui é insolúvel na maioria dos solventes. O quitosano, por sua vez, é solúvel em soluções acídicas diluídas, com pH inferior a 6 (39).

Outro polissacarídeo com aplicações biomédicas é o dextrano. O termo dextrano é atribuído a um grupo de polissacáridos de origem bacteriana compostos por unidades de α -D-glucose unidas por ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 6) (40). Este é solúvel numa grande

variedade de solventes, incluindo a água, e no organismo, pode ser metabolizado por enzimas existentes no fígado, baço, rim e parte inferior do trato gastrointestinal, as dextranases. A sua aplicação como biomaterial deve-se às suas propriedades biodegradáveis, biocompatíveis, não-imunogênicas e não antigênicas, sendo inócuo para o organismo humano (41). O alginato é um polissacarídeo extraído de algas. Estruturalmente é um copolímero linear composto por unidades de ácido α -L-gulurônico e de ácido β -D-manurônico unidas por ligações (1 \rightarrow 4) (figura 5.4). Devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, baixo custo de obtenção e facilidade de gelificação, este polissacarídeo tem tido diversas aplicações na área biomédica (42).

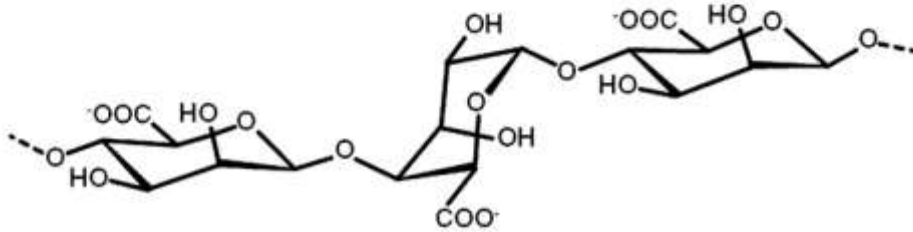


Figura 5.3-Estrutura química do alginato. Reproduzido de (42).

5.1.2 Polipéptidos

O colagénio é o principal elemento estrutural e a proteína mais abundante no reino animal. Este encontra-se presente na matriz extracelular e nos tecidos conjuntivos de diversos animais e tem como principal função fornecer suporte estrutural às células, servindo de apoio ao desenvolvimento de diversos tecidos e órgãos (43).

O termo colagénio é usado para denominar de forma genérica uma família de proteínas compostas por três cadeias polipeptídicas disposta em forma de tripla hélice. Entre os vários tipos de colagénio podem observar-se diferenças a nível estrutural, a nível da distribuição e em termos de função (43,44). Atualmente já foram identificados mais de vinte tipos de colagénio (44). De entre os vários tipos de colagénio existentes os mais abundantes são o colagénio de tipo I e tipo III. O colagénio de tipo I é o mais abundante, podendo ser encontrado na pele, em estruturas ósseas, tendões, ligamentos, vasos sanguíneos e discos intervertebrais. Este é composto por duas das cadeias idênticas entre si (α 1) e por uma terceira cadeia com estrutura química diferente (α 2). O colagénio de tipo III é o segundo tipo de colagénio mais abundante podendo ser encontrado justamente

com o tipo I na pele e em vasos sanguíneos, sendo este composto por três cadeia idênticas entre si (43). Através da desnaturação do colagénio, por hidrólise ácida ou alcalina é obtido outro polímero natural, a gelatina (45). A gelatina poderá ser usada como uma alternativa ao colagénio, uma vez que a gelatina tem demonstrado igual biocompatibilidade e biodegradabilidade associadas a menor custo de obtenção e menor poder antigénico, devido ao processo de desnaturação a que é submetida (46). A fibrina é um polímero natural obtido a partir do fibrinogénio, uma proteína existente no plasma sanguíneo e com um papel importante na hemostase. O fibrinogénio é clivado pela trombina e os fibrinopéptidos irão polimerizar e dar origem à fibrina (47).

5.2 Polímeros sintéticos

No grupo dos polímeros sintéticos incluem-se inúmeros polímeros, que podem dividir-se em vários subgrupos como poliésteres alifáticos, polianidridos, poliamidas, polímeros à base de fósforo e polímeros acrílicos, entre outros (tabela 5.2) (48,49).

Tabela 5.2--Polímeros sintéticos. Adaptado de (48,49).

Polímeros sintéticos	Poliésteres alifáticos	Ácido polilático, ácido poliglicólico, ácido (polilático-co-glicólico), poli (hidroxibutirato), policaprolactona, poli (propileno fumarato), ácido polimálico-β, poli (dioxanos)
	Polianidridos	Ácido polisebácico, ácido poliadípico, ácido politereftálico e vários copolímeros
	Poliamidas	Poli (carbonatos de imino), poliaminoácidos
	Polímeros á base de fósforo	Polifosfatos, polifosfonatos, polifosfazenos
	Polímeros acrílicos	Polimetacrilatos, poli (metacrilato de metilo), poli (2-hidroxietil metacrilato)
	Outros	Poli (acrilatos de ciano), poliuretanos, poli (orto ésteres), poli (etilenoglicol), poliacetais, poli(dihidropiranos), poli (vinil acetato), álcool polivinílico, poloxâmeros, poloxamina

Dentro destes, os polímeros mais usados em engenharia de tecidos são o poli (etilenoglicol) (PEG), ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), o álcool polivinílico (PVA) e o poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) (50).

Em termos de degradação os poliésteres alifáticos apresentam a vantagem de ser biodegradáveis. Os poliésteres alifáticos, como o próprio nome indica, correspondem a um grupo de polímeros que contêm uma ligação éster alifática, sendo removidos do organismo de forma natural, através da hidrólise dessa ligação (48,50). Após a hidrólise são originados produtos de degradação, variáveis consoante o polímero, que participarão

nas vias metabólicas do organismo. O tempo médio de degradação e o tipo de produto obtido encontram-se apresentados na tabela 5.3 (51).

Tabela 5.3- Propriedades físicas de poliésteres alifáticos usados como *scaffolds*. Reproduzido de (51).

Polímero	Tempo de degradação (meses)	Produto de degradação	Estrutura da unidade polimérica
Ácido polilático	12-18	L-ácido lático	$\left[\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Ácido poliglicólico	3-4	Ácido glicólico	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Poli caprolactona	>24	Ácido capróico	$-\text{O}-\left[\text{CH}_2 \right]_n-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$
Poli (ácido lático-co-glicólico) (50/50)	3-6	D, L-ácido lático e ácido glicólico	
Poli (ácido lático-co-glicólico) (85/15)	3-6	D, L-ácido lático e ácido glicólico	$\left[\text{O}-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right]_n$
Ácido polilático-co-glicólico) (90/10)	<3	D, L-ácido lático e ácido glicólico	

O ácido poliglicólico (PGA) é um polímero rapidamente degradável e com uma temperatura de transição vítrea (Tg) de 35-40 °C, passando do estado líquido para o estado sólido quando alcança esta temperatura. O ácido lático tem como particularidade apresentar quiralidade, encontrando-se disponível sob a forma de dois estereoisómeros,

ácido L-lático e ácido D-lático. Assim o polímero ácido polilático (PLA) poderá corresponder a apenas uma das variantes ou a uma mistura racémica. Em comparação com o PGA, o PLA possui uma temperatura de transição vítrea mais elevada, entre 60 e 65 °C, e apresenta um grupo metilo adicional que lhe confere maior hidrofobia e estabilidade à hidrólise. O ácido polilático-co-glicólico (PLGA) corresponde a um copolímero formado por unidades de ácido polilático em ambas as formas (L e D) e ácido poliglicólico. Este tem como vantagem ser composto por dois polímeros com propriedades diferentes, sendo possível otimizar algumas das suas características de acordo com a aplicação pretendida, através de alterações na proporção de cada um (48). Tanto o PGA, como o PLA e o seu copolímero (PLGA) têm uma longa história de uso como suturas cirúrgicas, com reportada biocompatibilidade e biodegradabilidade, tendo ganho aprovação para uso clínico (51). Devido a estas propriedades estes polímeros têm vindo a ser bastante investigado para aplicações biomédicas, como por exemplo produção de sistemas de libertação controlada de fármacos e *scaffolds* para engenharia de tecidos (48,51). Outro polímero sintético biodegradável é o poli(etilenoglicol) (PEG). O PEG, também conhecido como poli (óxido de etileno), é um polímero hidrofílico, biocompatível, com elevada permeabilidade, que possibilita a difusão de nutrientes, baixa imunogenicidade, baixo poder antigénico e limitada ligação a proteínas (10,52). Devido a estas propriedades tem vindo a ser usado no campo biomédico nomeadamente para libertação controlada de fármacos e engenharia de tecidos (53). Em termos da libertação controlada de fármacos o PEG tem vindo a ser utilizado para a obtenção de formulações lipossomais com longo tempo de circulação. Este polímero forma uma camada hidrofílica que reveste a superfície do lipossoma, inibindo o processo de reconhecimento molecular e a captura destes pelas células do sistema fagocitário, aumentando assim o tempo de permanência na corrente sanguínea (54). No campo da engenharia de tecidos o PEG pode ser utilizado para a formação de hidrogéis. Estes hidrogéis apresentam elevada capacidade de inchamento quando em meio aquoso, originando uma rede com elevado teor em água e propriedades viscoelásticas semelhantes às dos tecidos moles do organismo. Isso cria um ambiente favorável ao desenvolvimento celular e permite uma aplicação como biomateriais miméticos da matriz extracelular (55). O facto do PEG ser um polímero sintético torna-se vantajoso, uma vez que pode sofrer modificações químicas de modo a alterar algumas das suas características, nomeadamente a nível da resistência mecânica, de modo a ser possível a sua aplicação para desenvolvimento de diversos tecidos (52). Outros dois polímeros sintéticos também muito usados em aplicações

biomédicas são o poli (álcool vinílico) (PVA) e o poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA). Estes dois, através de processos de copolimerização, podem dar origem a hidrogéis não biodegradáveis que poderão ser aplicados para regeneração de tecido ósseo e cartilagem (56). O PVA é um polímero hidrofílico, que pode ser obtido a partir do poli (vinil acetato) através de alcoólise, hidrólise ou aminólise (57). Este é solúvel em água, não tóxico, biocompatível com boa resistência mecânica e baixa capacidade de adsorção às proteínas. Através de reticulação física ou química é possível a obtenção de hidrogéis deste polímero (58). Devido a estas características e à possibilidade de modificação de algumas das suas propriedades, de forma a se assemelhar aos tecidos humanos, este tem sido amplamente estudado para aplicações no campo biomédico. Algumas das suas aplicações mais comuns são lentes de contacto, colírios, barreiras de adesão celular e substituição artificial de cartilagem e do menisco (59). O hidrogel à base de PHEMA foi o primeiro a ser sintetizado, tendo desde aí vindo a ser usado em diversas aplicações, como por exemplo fabrico de lentes de contacto, biomembranas e libertação controlada de fármacos. Os hidrogéis formados a partir deste polímero apresentam hidrofilia, permeabilidade e biocompatibilidade (60).

6. Aplicação de hidrogéis em engenharia de tecidos

Os hidrogéis têm vindo a ser vastamente utilizados em engenharia de tecidos sendo que, para tal, deverão possuir algumas características, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, adequada resistência mecânica e estrutura favorável à adesão, proliferação e sobrevivência celular, assemelhando-se o mais possível da matriz extracelular (10). Têm sido referidas como vantagens destes o facto de em geral proporcionarem um ambiente aquoso, favorável ao crescimento e sobrevivência celular, bom transporte de nutrientes, o facto de poderem ser facilmente modificados e permitirem a incorporação de ligandos de adesão celular. Alguns dos hidrogéis podem ser injetados *in vivo*, gelificando à temperatura corporal. Em termos de desvantagens é apontado o facto de, por vezes, possuírem uma estrutura mecanicamente fraca, dependendo do polímero que lhes dá origem e de necessitarem de ser submetidos a processos de esterilização e purificação (61). De acordo com o tecido que se pretende regenerar e do objetivo final da aplicação, assim será escolhido o polímero para formar o hidrogel.

6.1. Hidrogéis de polímeros naturais

De entre as várias aplicações dos hidrogéis de polímeros naturais em engenharia de tecidos pode-se destacar a sua utilização como *scaffolds*. Na tabela 6.1 encontram-se apresentados alguns exemplos de aplicações como *scaffolds* já descritas de hidrogéis obtidos a partir de polímeros naturais.

Tabela 6.1-Algumas aplicações de hidrogéis de polímeros naturais como *scaffolds* em engenharia de tecidos. Adaptado de (6,10,62,63).

Tipo de polímero	Tipo de células estudadas	Tecido pretendido
Ácido hialurónico	Hepatócitos	Cardiovascular
	Condrócitos	Cartilagem
	Fibroblastos	Tecido Conjuntivo
		Pele
Osteoblastos	Tecido ósseo	
Ácido hialurónico-gelatina	-	Cordas Vocais
Gelatina	Condrócitos	Cartilagem
	Fibroblastos	Matriz extracelular
	.	Tecido vascular
Colagénio	Fibroblastos	Pele
	Condrócitos	Cartilagem
Alginato	Hepatócitos	Cardiovascular
	Condrócitos	Cartilagem
	Osteoblastos	Tecido ósseo
Quitosano	Osteoblastos	Tecido ósseo
Carboximetilcelulose	Hepatócitos	Cardiovascular
Fibrina	Células da medula óssea	Cardiovascular
	Condrócitos	Cartilagem

Dada a existência de muitos polímeros naturais e ao grande número de estudos já realizados, neste subcapítulo serão referidas apenas aplicações de hidrogéis de cinco dos polímeros naturais mais utilizados. Serão referenciados alguns dos estudos mais relevantes, nomeadamente alguns estudos com realização de ensaios *in vivo* e ensaios clínicos.

6.1.1. Colagénio

O colagénio é o polímero natural mais amplamente utilizado. Os hidrogéis podem ser obtidos através de reticulação física ou reticulação química. Quando são obtidos por reticulação física são termicamente reversíveis. As desvantagens dos hidrogéis de colagénio são o facto de apresentarem baixa resistência mecânica, serem potencialmente imunogénicos, poderem apresentar grandes variações na composição dependendo do lote e necessitarem de um processo de purificação dispendioso. Apesar destas desvantagens, os hidrogéis de colagénio têm sido muito usados em engenharia de tecidos devido à sua composição favorável à adesão, migração e diferenciação celular, ao facto de poderem ser formados *in situ*, serem biocompatíveis e biodegradáveis. Esta última característica deve-se ao facto do polímero ser degradado por enzimas existentes no organismo (colagenases) (57,64). O colagénio tem sido usado como *scaffold* para regeneração de diferentes tecidos, que incluem tecido nervoso, pele (65), tecido vascular, tecido ósseo e cartilagem (66), tecido intestinal e tecido hepático (57). Este polímero pode apresentar algumas limitações, sendo necessária a otimização de algumas características de acordo com o tecido que se pretende regenerar. Uma vez que apresenta uma elevada taxa de degradação, os seus hidrogéis apresentarão menor estabilidade e reduzida resistência mecânica. Estes aspetos podem ser otimizados através de alterações na concentração de colagénio, através de processos físicos ou processos de reticulação química. No entanto, os agentes de reticulação poderão apresentar alguma toxicidade (67,68).

Um dos agentes que tem vindo a ser utilizado, o glutaraldeído, aumenta a estabilidade do hidrogel, no entanto poderá ter um efeito tóxico devido à dificuldade de eliminar completamente os seus resíduos dos *scaffolds*. Em alternativa pode ser usado outro agente de reticulação, o hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), que até ao momento não demonstrou toxicidade (67).

Os hidrogéis de colagénio podem ser aplicados para a regeneração da derme e epiderme. Por exemplo, o Apilgraf® tem vindo a ser usado como substituto da pele para tratamento de feridas crónicas. Este material é composto por duas camadas de forma a mimetizar a derme e a epiderme. A primeira camada é constituída por um hidrogel de colagénio bovino de tipo I no qual são cultivados fibroblastos humanos, de modo a se assemelhar à estrutura nativa da derme, enquanto a segunda camada é composta por uma cultura de queratinócitos humanos. Têm sido apontadas como desvantagens deste substituto dérmico o custo elevado, baixa resistência à degradação, apresentando um

baixo tempo de vida útil e o baixo tempo de permanência dos fibroblastos no suporte (69–71). Com vista a ultrapassar estas limitações Helary et al. desenvolveram um hidrogel com elevada concentração de colagénio (5 mg/mL) e avaliaram o seu desempenho durante vinte e um dias, comparativamente a um hidrogel de colagénio de concentração média (3 mg/mL) e de baixa concentração (0.66 mg/mL) (71). Na figura 6.1 encontra-se representado um gráfico que traduz o crescimento celular ocorrido durante os vinte e um dias do estudo, no hidrogel com elevada concentração de colagénio (CCH5), no hidrogel de colagénio de concentração média (CCH3) e no de baixa concentração (NCH). No caso do hidrogel CCH5, verificou-se um maior número de fibroblastos viáveis comparativamente aos restantes, podendo concluir-se que o crescimento celular é dependente da concentração do polímero (71).

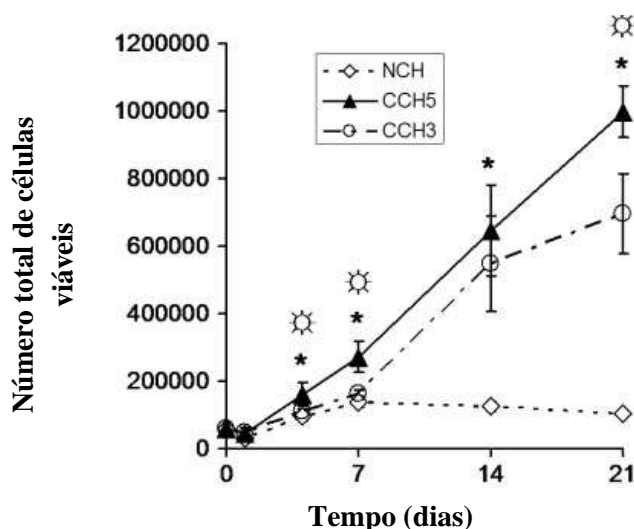


Figura 6.1-Crescimento celular nos hidrogéis de colagénio com concentração de 5 mg/mL (CCH5), de 3 mg/mL (CCH3) e de 0.66 mg/mL (NCH). Reproduzido de (71).

Na figura 6.2 encontra-se representado o gráfico com a percentagem de células apoptóticas em cada um dos hidrogéis estudados. Através da análise destes dados é possível verificar que a apoptose é inversamente proporcional à concentração de colagénio, ou seja, os hidrogéis de menor concentração apresentam maior número de células apoptóticas (71).

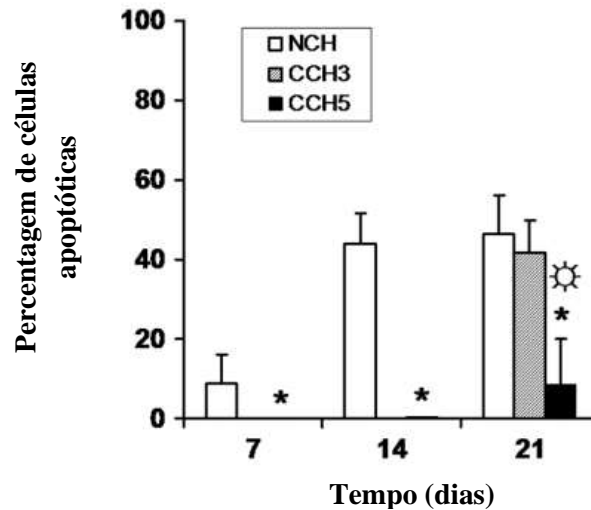


Figura 6.2-Percentagem de células apoptóticas em cada um dos hidrogéis estudados. Reproduzido de (71).

No final do estudo concluiu-se que os hidrogéis de colagénio com a maior concentração possibilitam uma maior permanência de fibroblastos sobre o suporte favorecendo a proliferação celular e limitando a apoptose. Deste modo os hidrogéis de colagénio com maior concentração poderão constituir uma boa opção para regeneração da derme (71).

Para além da aplicação acima referida os hidrogéis de colagénio poderão apresentar outras como é o caso da regeneração óssea. Com vista a esta aplicação Ma et al. prepararam um hidrogel híbrido contendo colagénio, hidroxiapatite e alendronato, um fármaco usado para o tratamento da osteoporose. Os hidrogéis foram sintetizados utilizando como agente de reticulação um composto orgânico encontrado em extratos de frutos de gardénia, a genipina. Foram preparados hidrogéis com diferentes proporções de hidroxiapatite e de alendronato e comparados os resultados obtidos. Para a realização dos testes de adesão e proliferação celular foi usada uma linhagem celular de pré-osteoblastos de murinos (MC3T3-E1). Estes hidrogéis apresentaram boas propriedades mecânicas e biodegradabilidade, podendo estas propriedades serem ajustadas através de alterações nas proporções de hidroxiapatite e alendronato e na alteração da concentração do agente reticulante. Apresentaram também biocompatibilidade e promoção da adesão e proliferação celular. Em suma, neste estudo realizado *in vitro* estes hidrogéis apresentaram potencial para aplicação como suportes para engenharia de tecido ósseo, sendo necessária futuramente a realização de estudos *in vivo* (72).

Outra aplicação possível dos hidrogéis de colagénio é a regeneração da córnea. Com esse intuito Xiao et al. desenvolveram um hidrogel de colagénio usando uma técnica designada compressão plástica e testaram a sua aplicação *in vivo*. A técnica utilizada permitiu a obtenção de um hidrogel de colagénio fino e transparente e com melhoria nas propriedades mecânicas (73).

Para a realização dos estudos *in vivo* foram usados vinte coelhos brancos New Zealand sendo estes divididos em dois grupos, grupo experimental e grupo de controlo. Nos animais pertencentes ao grupo experimental foi implantado o hidrogel de colagénio enquanto que no grupo de controlo foi implantada uma membrana amniótica. Foram observados os olhos passados um, sete, catorze, vinte e um, sessenta, noventa e cento e vinte dias do implante. Durante este período não foi observado formação significativa do edema, inflamação, ou neovascularização nos dois grupos, demonstrando que ambas as abordagens são biocompatíveis (figura 6.3)(73).

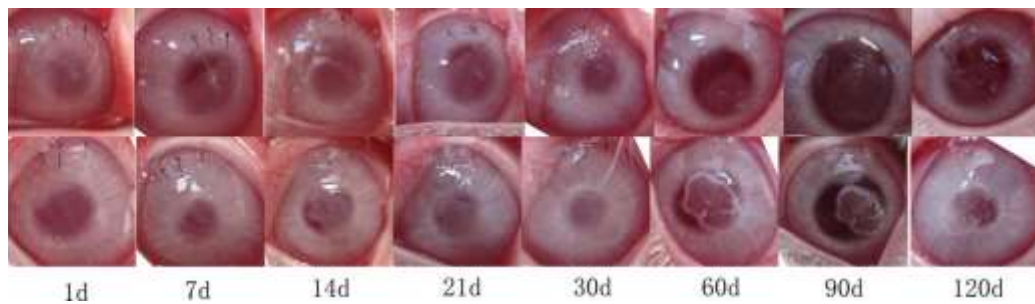


Figura 6.3-Fotografias representativas das córneas transplantadas, no grupo experimental (linha superior) e no grupo controlo (linha inferior). Reproduzido de (73)

Para além disso, através da análise das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varrimento foi possível verificar que as fibras de colagénio do hidrogel se encontravam densamente comprimidas e uniformemente arranjadas. Em conclusão, este hidrogel formado demonstrou boa biocompatibilidade associada a melhorias das propriedades mecânicas podendo vir a ser aplicado como *scaffold* para regeneração da córnea (73).

6.1.2. Gelatina

A gelatina, polímero derivado do colagénio, também tem sido aplicada em engenharia de tecidos (46). A gelatina tem por si só facilidade de gelificação, sendo possível melhorar esta característica através da sua modificação química, como é o exemplo da adição de grupos de metacrilamida. Estes grupos permitem manter as propriedades originais do polímero e dão origem a uma solidificação permanente da gelatina, aumentando a sua estabilidade (68). Num estudo realizado por Zhao et al. foram sintetizados hidrogéis com diferentes concentrações de gelatina modificados com metacrilamida (Gel-MA) e avaliada a adesão, proliferação e diferenciação de queratinócitos, com vista a uma aplicação na regeneração da epiderme. Foram usadas soluções com concentrações entre 5 a 20% de gelatina-metacrilamida. Durante cinquenta e seis dias foi observada a evolução do hidrogel em termos de resistência mecânica, biodegradabilidade e capacidade de regeneração epidérmica (68).

Na figura 6.4. encontra-se representado o gráfico com a percentagem de massa restante, para cada hidrogel, ao longo dos cinquenta e seis dias de estudo. Através deste é possível verificar que o hidrogel com concentração de 20% apresenta menor taxa de degradação que os restantes, permanecendo cerca de 25% da sua massa total passados estes dias (68).

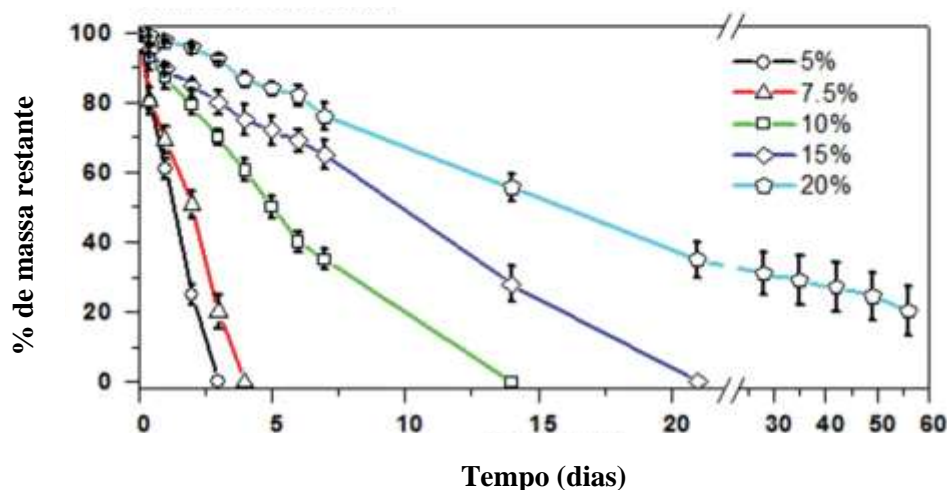


Figura 6.4-Percentagem de massa restante em cada hidrogel ao longo dos cinquenta e seis dias de estudo. Reproduzido de (68).

Após análise da taxa de degradação dos vários hidrogéis foi escolhido o hidrogel de Gel-MA com concentração de 20% para o restante estudo, sendo seguidamente

realizado um ensaio de desenvolvimento da epiderme *in vitro*. Para tal foram usados queratinócitos humanos imortalizados. Na figura 6.5 é possível visualizar secções de epiderme coradas com eosina e hematoxilina. As imagens A correspondem a secções coradas de epiderme reconstruída usando o *scaffold* à base de hidrogel de gelatina modificado com metacrilamida, enquanto as imagens B são referentes a secções coradas de epiderme reconstruída a partir de um *scaffold* de hidrogel de colagénio. Foi observado o desenvolvimento da epiderme após duas semanas de cultura celular (imagens Ai e Bi) e após seis semanas (imagens Aii e Bii). Não foi visualizada nenhuma diferença significativa a nível da espessura entre a epiderme cultivada recorrendo a hidrogéis de Gel-MA e recorrendo a hidrogéis de colagénio. No entanto, após as seis semanas de cultura, é possível visualizar que os hidrogéis de Gel-MA ainda se encontram presentes contrariamente ao hidrogel de colagénio que é praticamente impercetível, indicando maior estabilidade dos hidrogéis de Gel-MA a 20% (68).

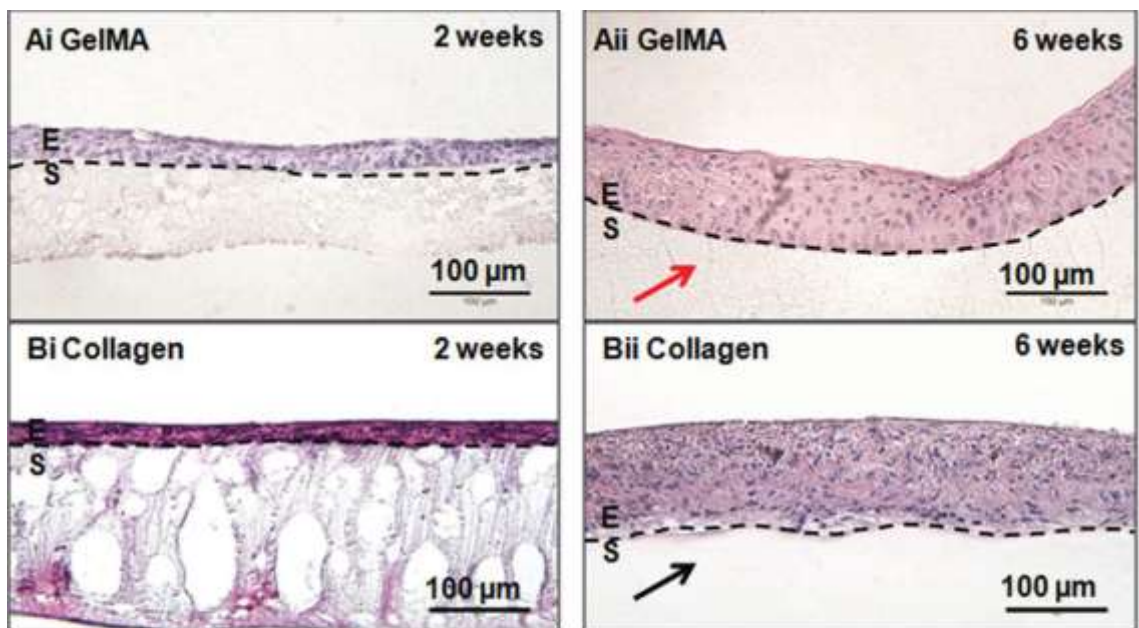


Figura 6.5-Secções coradas com eosina e hematoxilina de epiderme reconstruída em scaffolds de hidrogéis de Gel-MA (A) e de hidrogéis controlado de colagénio (B), após duas semanas (i) e seis semanas (ii) de cultura. E= epiderme, S=scaffolds. Reproduzido de (68).

Os autores concluíram que os hidrogéis de maior concentração apresentam melhores propriedades mecânicas associadas a maior resistência à degradação pelas colagenases. Os hidrogéis de Gel-MA funcionam como suporte para o crescimento e

diferenciação dos queratinócitos e estratificação em múltiplas camadas para reconstrução da epiderme. Este tipo de hidrogéis, cultivados com queratinócitos, poderá ser usado como substituto da epiderme, pensos para feridas, ou substratos para construir vários modelos de pele *in vitro* (68).

Noutro estudo, realizado por McCain et al., foi desenvolvido e testado um hidrogel de gelatina para engenharia de tecido cardíaco. Foram usados dois tipos de células, sendo eles cardiomiócitos de ratos neonatos e cardiomiócitos humanos derivados de células-tronco de pluripotência induzida. Foi observada adesão de ambos os cardiomiócitos ao hidrogel de forma natural, não sendo necessária a adição de proteínas de adesão ao hidrogel. Este hidrogel de gelatina demonstrou também possibilitar a cultura a longo prazo dos cardiomiócitos de rato e dos de origem humana, podendo vir a ser aplicado como suporte para a engenharia de tecido cardíaco (74).

Para além destas aplicações os hidrogéis de gelatina também têm sido utilizados para a administração de fatores de crescimento para promover a vascularização de novos tecidos (57).

6.1.3. Ácido Hialurónico

O ácido hialurónico é um dos componentes da matriz extracelular, composto por ácidos carboxílicos e álcoois, grupos funcionais que podem ser utilizados para introduzir outros domínios funcionais ou para obter hidrogéis através de processos de reticulação. Apresenta biodegradabilidade devido à presença de hialuronidases no organismo, é biocompatível e tem capacidade de bioreabsorção (75). Os hidrogéis de ácido hialurónico podem ser obtidos através de reticulação química, usando como agentes de reticulação vários tipos de derivados de hidrazida, ou por polimerização radicalar com metacrilato de glicidilo (57).

Devido às características acima citadas e à sua elevada viscoelasticidade, e ainda por ser um polímero endógeno, o ácido hialurónico constitui uma boa opção para aplicação em engenharia de tecidos, estando reportada a sua aplicação para preenchimento dérmico, regeneração da córnea, cicatrização de feridas, reparação e regeneração óssea e de cartilagem, entre outros (35,75).

Devido à sua capacidade de retenção de água e peso molecular elevado, os hidrogéis de ácido hialurónico permitem obter um ambiente adequado ao desenvolvimento celular (50,75).

Num estudo sobre reparação e regeneração da cartilagem, Erickson et al., tentaram inferir se o aumento do número de células mesenquimais semeadas sobre o hidrogel de ácido hialurónico e o aumento da densidade das cadeias poliméricas teriam influência no processo de crescimento e diferenciação celular. O intuito foi testar o potencial do polímero como substituto da cartilagem humana. Para tal, foram sintetizados hidrogéis de ácido hialurónico metacrilado (HA-MA) com concentrações (m/v) de 1%, 3% e 5%. Os autores do estudo optaram por usar ácido hialurónico modificado, neste caso metacrilado, de modo a obter um hidrogel covalentemente reticulado, obtendo-se uma estrutura mais estável. Sobre estes foram semeadas células mesenquimais, previamente isoladas de fêmures de bovinos jovens, na concentração de 20 ou 60 milhões de células/mL. As células foram cultivadas durante quatro e oito semanas, sendo a cada intervalo de tempo avaliadas as propriedades biomecânicas, bioquímicas e histológicas do hidrogel (76).

Verificou-se que o aumento da concentração de células mesenquimais semeadas leva ao aumento das células viáveis e ao mesmo tempo não compromete a viabilidade do hidrogel. No entanto, contrariamente ao que os autores esperavam, no caso dos hidrogéis de HA-MA de 3% e 5% o aumento da densidade de células mesenquimais não melhorou as propriedades da matriz formada. Demonstrou-se assim que as concentrações mais elevadas são menos permissivas para o desenvolvimento de uma matriz funcional, sendo que o hidrogel de ácido hialurónico com menor densidade (1%) apresentou melhor microambiente para o crescimento celular (76).

Num estudo mais recente foi desenvolvido um hidrogel de ácido hialurónico injetável com formação *in situ*. Para a obtenção deste hidrogel foi usado um derivado do ácido hialurónico, o ácido hialurónico tiolado, sendo o hidrogel formado através do estabelecimento de ligações dissulfeto entre dois grupos tiol livres. Foram preparados vários hidrogéis usando ácido hialurónico com diferentes graus de substituição tiol e diferentes pesos moleculares. Foram analisadas as propriedades dos vários hidrogéis obtidos e a possibilidade da sua aplicação como *scaffolds* para o desenvolvimento de novos tecidos (77).

Realizaram-se estudos *in vitro* e *in vivo*. Para a realização dos estudos *in vivo* foram injetados subcutaneamente hidrogéis sem células (controlo) e hidrogéis contendo condrócitos em ratinhos. Os resultados obtidos mostraram que é possível controlar o

tempo de gelificação, as propriedades de inchamento, propriedades mecânicas e degradação dos hidrogéis podendo ser otimizadas de modo a se assemelhem às do tecido a substituir. Os hidrogéis mostraram biocompatibilidade, observando-se proliferação celular ao longo dos 21 dias de cultura *in vitro*. Nos estudos *in vivo*, durante o decorrer destes, os hidrogéis demonstraram boa estabilidade e baixa taxa de degradação. Verificou-se também um aumento da densidade de celular a longo dos 28 dias de estudo demonstrando que os hidrogéis formados apresentam boa biocompatibilidade e permitem a adesão e proliferação celular *in vivo*. É possível então concluir que estes hidrogéis apresentam um grande potencial para aplicação em engenharia de tecidos (77).

Para além da aplicação dos hidrogéis de ácido hialurónico como suporte para o desenvolvimento de novos tecidos estes também podem ser aplicados para a libertação controlada de fármacos. Por exemplo, hidrogéis de ácido hialurónico injetáveis podem ser usados para libertação controlada de fatores adipogénicos, como por exemplo insulina, para regeneração de tecido adiposo (78).

6.1.4. Alginato

Os hidrogéis de alginato podem ser obtidos, em meio aquoso, através do estabelecimento de interações iónicas com catiões divalentes (32). Têm sido descritas aplicações deste em regeneração da pele (10,79), de cartilagem, de tecido ósseo (63,80) e tecido cardíaco (81).

Por exemplo, para regeneração de tecido ósseo, Rubert et al. desenvolveram um estudo com o objetivo de comparar as propriedades estruturais, físico-químicas, a biocompatibilidade e bioatividade de hidrogéis de alginato e hidrogéis de ácido hialurónico, com diferentes concentrações. Para a síntese dos hidrogéis foram usadas soluções de ambos os polímeros com concentrações de 1%, 2% e 3% (m/v). Foi também usada uma linha celular osteoblástica derivada de rato MC3T3-E1 (63).

Após preparação dos hidrogéis foram analisadas algumas das suas propriedades tais como a viscosidade, pH e diâmetro dos poros de modo a identificar as condições ótimas para a preparação dos *scaffolds*. Em termos de viscosidade ambos os polímeros demonstraram um aumento desta associada ao aumento da concentração do polímero e redução associada ao aumento da temperatura de 25 °C para 37 °C. Relativamente ao pH os hidrogéis apresentaram um valor semelhante ao pH fisiológico. No caso dos hidrogéis

de alginato os valores de pH obtidos para as diferentes concentrações foram muito semelhantes entre si, no caso do ácido hialurónico observou-se uma pequena diminuição do pH associado ao aumento da concentração. No que toca à porosidade os hidrogéis de ácido hialurónico apresentam poros de menor diâmetro do que os hidrogéis de alginato e em ambos os hidrogéis verificou-se uma diminuição do tamanho do poro associada ao aumento da concentração de polímero (63).

Após 24 h da adição das células aos hidrogéis procedeu-se à recolha do meio de cultura para avaliar a citotoxicidade destes. Para avaliar esta componente foi usado como índice a atividade da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura. Como é possível verificar através da análise do gráfico presente na figura 6.6, nenhum dos hidrogéis testados apresenta um efeito tóxico sobre as células MC3T3-E1, sendo observada maior viabilidade celular no caso do hidrogel de alginato a 1% comparativamente ao hidrogel de ácido hialurónico com a mesma concentração (63).

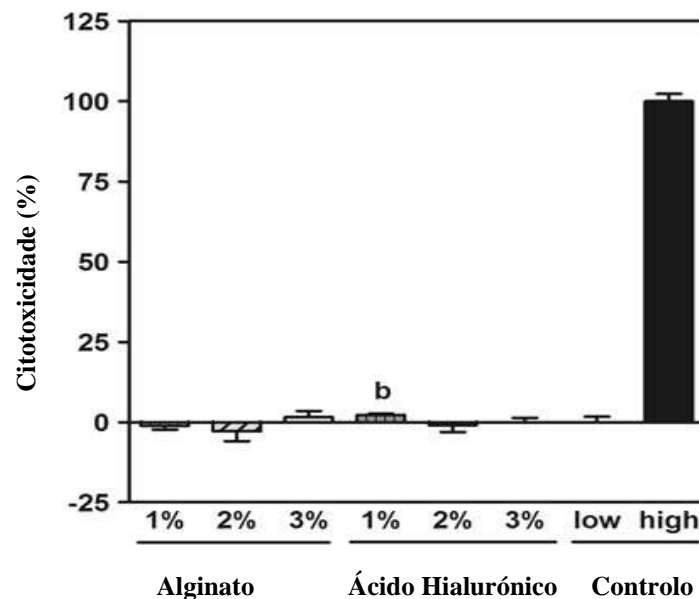


Figura 6.6- Atividade da LDH medida a partir de meios de cultura recolhido 24 h após a exposição das células MC3T3-E1 com hidrogéis de alginato e hidrogéis de ácido hialurónico com diferentes concentrações de polímeros (1%, 2% e 3%). Reproduzido de (63).

Passados vinte e um dias foram recolhidas células e analisado o seu número, níveis de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina (63). A fosfatase alcalina (ALP) corresponde a uma enzima expressa por células durante a osteogénese (82). O teor em cálcio intracelular foi quantificado e analisado como indicador de diferenciação celular. Em relação à atividade da ALP, como é possível visualizar na figura 6.7, as células presentes

nos hidrogéis de alginato apresentaram maior atividade desta comparativamente as células que se encontravam nos hidrogéis de ácido hialurónico (63).

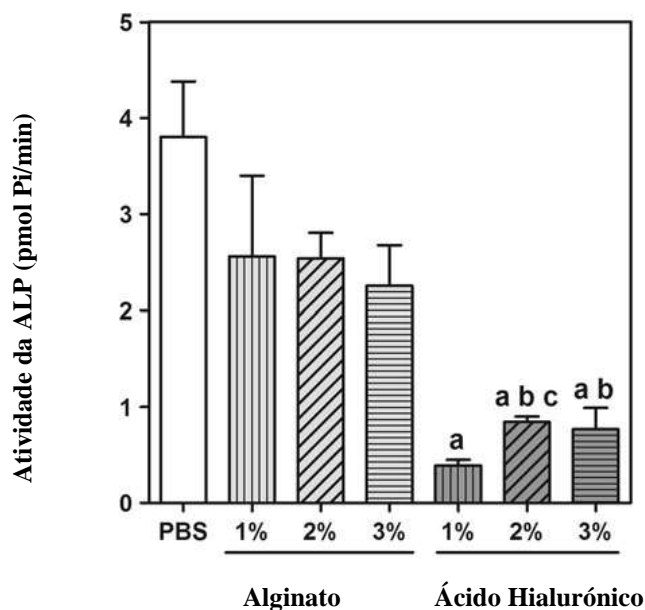


Figura 6.7- Atividade de fosfatase alcalina (ALP) nas células MC3T3-E1 cultivadas durante 21 dias em hidrogéis de alginato e hidrogéis de ácido hialurónico com diferentes concentrações de polímero (1, 2 e 3%). Reproduzido de (63).

Em relação ao teor em cálcio as células cultivadas em hidrogéis de alginato apresentaram maior teor do que as células de controlo e foi verificado um aumento deste teor com o aumento da concentração do polímero. No entanto, os autores não conseguiram analisar o teor em cálcio das células cultivadas em hidrogéis de ácido hialurónico devido a uma interferência deste polímero no método para determinação utilizado (63).

Após a realização do estudo foi possível concluir que ambos os hidrogéis apresentam biocompatibilidade permitindo a sobrevivência e proliferação celular. Os hidrogéis de alginato apresentaram níveis superiores de atividade de fosfatase alcalina relativamente aos hidrogéis de ácido hialurónico e maior teor em cálcio comparativamente com o controlo. Assim, foi possível inferir que os hidrogéis de alginato apresentaram maior indução da diferenciação dos osteoblastos que os hidrogéis de ácido hialurónico, sugerindo que os hidrogéis de alginato são mais adequados para aplicações como biomateriais em engenharia de tecido ósseo (63).

Nesse seguimento, noutro estudo, foi avaliada a aplicação *in vivo* de um hidrogel composto por matriz extracelular óssea, desmineralizada e sem células, e alginato (83).

A este hidrogel foram adicionadas células humanas isoladas do estroma da medula óssea e alguns fatores de crescimento selecionados. Foram usados diferentes tipos de hidrogéis, de modo a avaliar a bioatividade da matriz extracelular óssea. Foi então preparado um hidrogel composto por alginato e colagénio, um hidrogel composto por alginato e matriz extracelular óssea sujeito a irradiação com luz ultravioleta, de modo a inativar os fatores de crescimento endógenos dentro da matriz, e hidrogéis compostos por alginato e matriz extracelular óssea com e sem adição de fatores de crescimento exógenos. Os hidrogéis foram implantados em ratinhos e analisados os resultados passados 28 dias. Comparando os hidrogéis apenas compostos por alginato e matriz extracelular óssea com os hidrogéis aos quais se adicionaram fatores de crescimento exógenos verificou-se que a adição destes fatores não aumentou a formação óssea. No entanto, verificou-se diferença entre os hidrogéis sujeitos a irradiação e os restantes, sendo que os primeiros apresentaram menor formação óssea. Deste modo, foi possível concluir que a componente da matriz extracelular óssea, devido aos de fatores de crescimento endógenos nela presentes, apresenta por si só capacidade osteoindutora, não sendo necessária a adição de fatores de crescimento exógenos. A adição do alginato contribuiu para a melhoria da estabilidade estrutural da matriz extracelular. Em todos os hidrogéis foi observada invasão dos hidrogéis por parte do tecido hospedeiro e vascularização. A combinação do hidrogel de alginato com a matriz extracelular óssea permitiu a obtenção de um *scaffold* bioativo para aplicação em medicina regenerativa nomeadamente para regeneração de tecido ósseo (83).

Outra possível aplicação dos hidrogéis de alginato é a regeneração de tecido cardíaco. Dahlmann et al. desenvolveram um hidrogel contendo alginato e ácido hialurónico com formação *in situ* para engenharia de tecido do miocárdio. O alginato e o ácido hialurónico foram submetidos a processos químicos de modo a obter os seus derivados aldeídicos e hidrazídicos. O hidrogel formou-se por reticulação espontâneo em meio aquoso, através de reação de condensação dos grupos aldeído e hidrazida (81).

Foram usados cardiomiócitos isolados de tecido cardíaco de ratos neonatos, com idades compreendidas entre um e três dias. Para a preparação do tecido cardíaco bioartificial os polímeros foram suplementados com colagénio humano de tipo I (81).

Verificou-se que as propriedades físicas e mecânicas dos hidrogéis podem ser ajustadas através da derivatização dos polímeros e da alteração da concentração e composição da mistura polimérica. Observou-se também que a adição do colagénio permitiu a adesão, proliferação e integração das células na matriz formada, permitindo a formação de um novo tecido, com características semelhantes ao miocárdio (81).

Com este estudo foi possível concluir que estes hidrogéis compostos por alginato e ácido hialurónico e suplementados com colagénio para além de não apresentarem citotoxicidade, apresentam grande potencial de ajuste das suas propriedades mecânicas, permitindo a otimização das mesmas de modo a melhor mimetizarem o miocárdio. Deste modo estes hidrogéis poderão vir a ser aplicados para reconstrução do músculo cardíaco (81).

Para além das aplicações acima descritas o alginato também pode ser combinado com outros polímeros naturais como é o caso da agarose. Por exemplo, o Cartipatch® é composto por um hidrogel híbrido de alginato e agarose cultivado com condrócitos autólogos, sendo usado como *scaffold* para regeneração de cartilagem hialina. Foram realizados ensaios clínicos com este hidrogel sendo implantado em 17 indivíduos, com idades compreendidas entre os 17 e 42 anos, e acompanhado o seu desenvolvimento ao longo de dois anos. No decorrer deste período foi observada a formação de cartilagem hialina em 8 dos 17 pacientes, demonstrando a potencialidade de aplicação deste hidrogel (84–86).

6.1.5. Quitosano

O quitosano tem vindo a ser aplicado em engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formação de hidrogéis *in situ*.

O BST-CarGel®, por exemplo, corresponde a um hidrogel injetável copolimérico, formado por quitosano e glicerol, usado como *scaffold* para a regeneração de cartilagem. Foi realizado um ensaio clínico com 80 indivíduos, de idades compreendidas entre 18 e 55 anos, com vista a testar a sua evolução clínica e estrutural durante 5 anos. Neste ensaio foi verificado que a aplicação deste hidrogel proporciona maior recuperação da lesão associada a melhorias a nível da dor, rigidez e função. Em suma, concluiu-se que a aplicação deste hidrogel apresenta benefício clínico (84,87)

No mesmo seguimento, Tan et al. realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o potencial de aplicação de hidrogéis injetáveis compostos por quitosano e ácido hialurônico para engenharia de tecidos cartilaginoso. Para tal foram usados hidrogéis com diferentes proporções destes dois polímeros e observada a influência desta variação nas suas propriedades (88). Os autores deste estudo optaram por usar um derivado do quitosano, o *N*-succinil-quitosano (S-CS) e uma forma oxidada do ácido hialurônico, ácido hialurônico aldeído (A-HA). O S-CS em relação ao quitosano apresenta como vantagem maior solubilidade em solventes orgânicos e a forma oxidada do ácido hialurônico tem a vantagem de permitir a formação de ligações reticuladas. O hidrogel é então obtido através da reação entre os grupos amino e aldeído, sendo esta uma reação de reticulação com formação de uma base de Schiff ($-C=N-$) (88). Foram usadas soluções com diferentes rácios de S-CS/A-HA, sendo eles 1/9, 3/7, 5/5, 7/3, 9/1. Aos hidrogéis foram adicionados condrócitos articulares de origem bovina, previamente isolados, com uma densidade de 500×10^4 células/mL de hidrogel. No que toca à morfologia, na figura 6.8 encontram-se apresentadas imagens dos diferentes hidrogéis obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. É possível visualizar que uma maior proporção de S-CS resulta na formação de poros com menor diâmetro e estrutura de rede mais apertada (88).

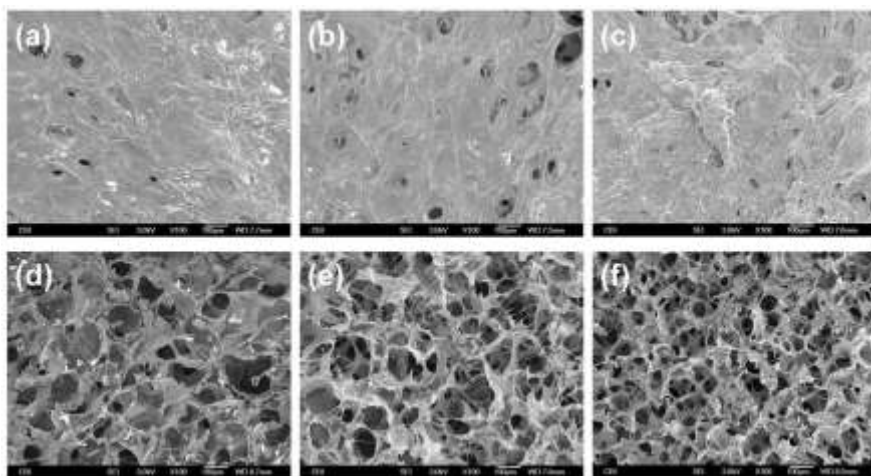


Figura 6.8- Imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento de hidrogéis compostos S-CS / A-HA liofilizado. (A) - (c) morfologia de superfície de hidrogéis com a proporção em volume de 07/03 (a), 5/5 (b) e 7/3 (c). (D) - (f) morfologia transversal de hidrogéis com a proporção em volume de 07/03 (d), 5/5 (e) e 7/3 (f). Reproduzido de (88).

A nível da sobrevivência celular foi observado um maior número de condrócitos nos hidrogéis 5/5 e 7/3 comparativamente aos restantes (figura 6.9). No entanto, todos os hidrogéis apresentaram menor número de condrócitos do que no caso do fosfato tricálcico usado como controlo (88). O fosfato tricálcico é um material cerâmico que tem vindo a ser usado como biomaterial para substituição óssea devido à sua biodegradabilidade e osteocondutividade (89). No caso do hidrogel 5/5 os autores analisaram a morfologia dos condrócitos sendo concluído que estes mantiveram a sua morfologia típica, podendo este hidrogel ser uma escolha adequada para o desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecido cartilaginoso (88).

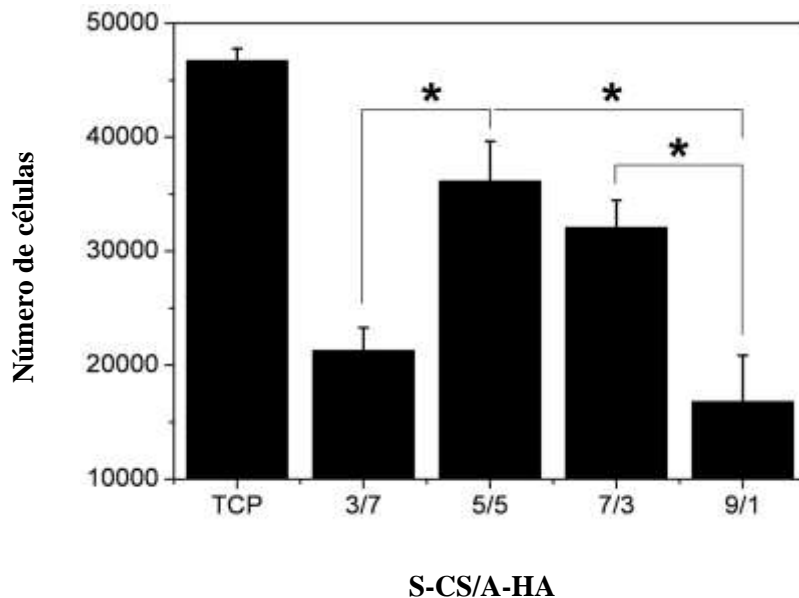


Figura 6.9- Número de condrócitos bovinos aderidos à superfície dos hidrogéis comparativamente com os poços de controlo. TCP-fosfato tricálcico. Reproduzido de (88)

Com este estudo concluiu-se que este hidrogel composto permite a adesão e proliferação de condrócitos e poderá ser aplicado futuramente em engenharia de tecido cartilaginoso (88).

Para além desta aplicação o quitosano tem demonstrado ser um material com potencial para desenvolvimento de *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo. Este polímero permite a ligação e proliferação de osteoblastos e a formação de uma matriz óssea mineralizada (62).

Noutro estudo, realizado por Dhivya et al., foi avaliada a aplicação de um hidrogel de quitosano reforçado com nanohidroxiapatite para reparação de tecido ósseo. Foi

testado um hidrogel contendo nanohidroxiapatite e outro sem este componente sendo que a ambos os hidrogéis de quitosano foi adicionado zinco e β -glicerofosfato (90).

A hidroxiapatite corresponde a um componente mineral, quimicamente semelhante à componente inorgânica da matriz óssea, tendo descritas como propriedades suas osteocondutividade, osteoindutividade, e lenta taxa de biodegradação (91). O zinco também é encontrado em tecido ósseo, tendo como acção a estimulação da osteoblastogenese e supressão da osteoclastogenese, estimulando o crescimento ósseo e diminuindo a degradação do mesmo (92). O β -glicerofosfato é um fosfato inorgânico sendo usado com o objetivo de induzir a mineralização do tecido formado (93).

Foram usadas células estaminais mesenquimais de rato. Primariamente foram realizados estudos *in vitro* e posteriormente estudos *in vivo*. Para a realização dos últimos foram implantados hidrogéis em defeitos tibiais de rato e analisado o desenvolvimento dos mesmos duas semanas após a implantação. Os estudos *in vivo* realizados demonstraram que hidrogéis apresentam uma temperatura de transição vítrea de 37 °C e que estes não apresentam toxicidade para as células estaminais mesenquimais. No que diz respeito à diferenciação celular foram realizados testes com ambos os hidrogéis, com e sem estimulação osteogénica e analisados os resultados passados sete e quatorze dias. No caso do hidrogel contendo nHAp, quando sujeito a estimulação osteogénica, os autores verificaram uma maior diferenciação osteoblástica do que no hidrogel sem nHAp. Em relação aos estudos realizados *in vivo* na figura 6.10 encontram-se imagens de radiografias obtidas duas semanas após o preenchimento dos defeitos tibiais com os hidrogéis, sendo possível verificar maior cicatrização óssea no caso do hidrogel de Zn-CS / nHAp / β -GP (90).

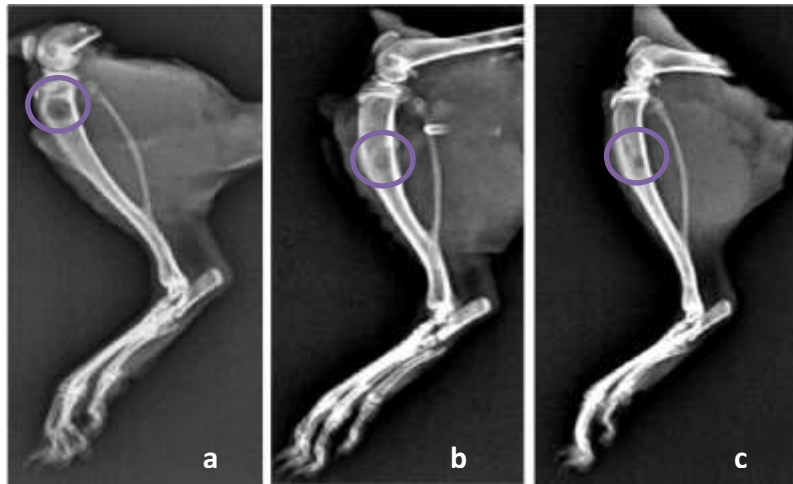


Figura 6.10- Imagens radiográficas dos defeitos tibiais de ratos obtidas duas semanas após o seu preenchimento com o hidrogel de Zn-CS / β -GP e o hidrogel de Zn-CS / nHAp / β -GP. (a) Controle, (b) hidrogel de Zn-CS / β -GP, (c) hidrogel de Zn-CS / nHAp / β -GP. Reproduzido de (90).

Através deste estudo os autores puderam concluir que estes hidrogéis não apresentam citotoxicidade, permitindo a adesão e proliferação celular e que a adição de nHAp é vantajosa uma vez que aumenta a diferenciação das células estaminais mesenquimais em osteoblastos e acelera a formação de tecido ósseo. Deste modo estes hidrogéis poderão vir a ser aplicados para regeneração óssea (90).

A aplicação de hidrogéis de quitosano para regeneração óssea também foi estudada por Liskova et al. Estes autores desenvolveram hidrogéis injetáveis de quitosano contendo β -glicerofosfato de sódio e magnésio. Neste estudo os hidrogéis demonstraram igualmente citocompatibilidade e potencialidade de aplicação destes (94).

Num estudo realizado por Wang et al. foram preparados hidrogéis injetáveis de quitosano e avaliada a potencialidade da sua aplicação como suporte para o crescimento e diferenciação de células estaminais derivadas de tecido adiposo castanho para regeneração de miocárdio (95).

Foi avaliado o efeito *in vitro* do quitosano na diferenciação celular através da medição da percentagem de células com expressão de troponina T e da expressão de marcadores cardíacos específicos, verificando-se que o quitosano melhorou significativamente a diferenciação cardíaca das células usadas. Para a realização dos estudos *in vivo* foram usados ratos com historial de enfarte do miocárdio, sendo injetadas células estaminais derivadas de tecido adiposo castanho com ou sem hidrogel de quitosano no coração dos mesmos. Através da análise dos dados obtidos foi possível

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

verificar que a aplicação do hidrogel de colagénio se mostrou vantajosa, uma vez que, nos animais onde este foi implantado se verificou maior adesão, sobrevivência e diferenciação celular e aumento significativo da função cardíaca comparativamente aos restantes animais. Estes resultados sugerem que a aplicação de hidrogéis de quitosano juntamente com células estaminais derivadas do tecido adiposo castanho poderá constituir uma boa alternativa terapêutica para a regeneração do miocárdio (95).

6.2. Hidrogéis de polímeros sintéticos

Tal como os hidrogéis de polímeros naturais, os hidrogéis obtidos a partir de polímeros sintéticos também podem ser aplicados como *scaffolds* em engenharia de tecidos. Na tabela 6.2 apresentam-se algumas das aplicações já descritas destes hidrogéis como *scaffolds* em engenharia de tecidos.

Tabela 6.2 -Algumas aplicações de hidrogéis de polímeros sintéticos como *scaffolds* em engenharia de tecidos. Adaptado de (6,10).

Tipo de polímero	Tipo de células estudadas	Tecido pretendido
PEG	Fibroblastos	Tecido ósseo
	Condrócitos, células-tronco mesenquimais	Cartilagem
	Células endoteliais	Vascular
	Células do musculo liso	
PEG-PLA	Condrócitos	Cartilagem
PHEMA	Mioblastos	Músculo esquelético
	-	Tecido ocular
PVA	Condrócitos	Cartilagem

Dada a existência de muitos polímeros sintéticos, seguidamente serão referidas apenas aplicações de hidrogéis de quatro desses polímeros. Serão referenciados alguns dos estudos mais relevantes, nomeadamente alguns estudos com realização de ensaios *in vivo*.

6.2.1. Poli (2-hidroxietil metacrilato)

Devido às excelentes propriedades mecânicas e à elevada hidrofobia, o poli (2-hidroxietil metacrilato) tem vindo a ser uma opção de escolha para o fabrico de *scaffolds*. No entanto, os hidrogéis formados não são biodegradáveis não podendo ser aplicados em engenharia de tecidos (96). De modo a ultrapassar esta limitação e a possibilitar a obtenção de hidrogéis biodegradáveis, permitindo a sua substituição de forma progressiva por novo tecido, são necessárias algumas modificações aquando da síntese dos polímeros (97).

Zhang et al. realizaram um estudo tendo como objetivo o desenvolvimento de um hidrogel biodegradável de PHEMA. Para tal, utilizou-se uma técnica de polimerização assistida por micro-ondas, usando PHEMA como matéria-prima, persulfato de potássio como o iniciador, e policaprolactona (PCL) como aditivo de reticulação (96). A PCL é um poliéster alifático, apresentando biodegradabilidade derivada da suscetibilidade das ligações éster à degradação enzimática ou hidrolítica. Este polímero apresenta uma cinética de degradação mais lenta, comparativamente aos outros poliésteres alifáticos, sendo favorável para o fabrico de *scaffolds*, uma vez que se poderá assemelhar à taxa de desenvolvimento dos tecidos (98).

Após a síntese foram avaliadas as propriedades físicas e químicas do hidrogel, a sua degradação e toxicidade a nível celular, de modo a ser possível inferir a viabilidade da sua utilização para engenharia de tecidos. Em termos de degradação, os estudos efetuados demonstraram um bom perfil de degradação, sendo degradado 75% do hidrogel decorridos dezassete dias. Em termos de compatibilidade celular, os hidrogéis não demonstraram resposta citotóxica nos ensaios realizados *in vitro*. Com este estudo é possível concluir que através de algumas modificações são obtidos hidrogéis biodegradáveis de PHEMA e que estes apresentam boas características para a sua aplicação em engenharia de tecidos (96).

Outra estratégia para a obtenção de hidrogéis biodegradáveis de PHEMA é a sua combinação com polímeros naturais, como é o caso da gelatina (97,99). Num estudo realizado foram sintetizados cinco tipos de hidrogéis de PHEMA sendo eles: PHEMA, PHEMA-gelatina, PHEMA-gelatina-glicerofosfato, PHEMA-gelatina-glutaraldeído e PHEMA-hidroxiapatite e analisadas as suas características com vista a serem aplicados para engenharia de tecido ósseo. Em termos de degradação, passados 28 dias, os hidrogéis que apresentaram maior taxa de degradação foram os hidrogéis de PHEMA-gelatina, e PHEMA-gelatina-glicerofosfato sendo degradado 12 e 15%, respetivamente. Para realização dos estudos celulares foi utilizada uma linhagem celular osteoblástica previamente isolada de ratos. Através da análise dos dados obtidos verificou-se que a adição de gelatina ao hidrogel de PHEMA originou um aumento da adesão, proliferação e diferenciação celular. Associando esta característica ao facto da gelatina aumentar a biodegradabilidade do PHEMA é possível concluir que os hidrogéis de PHEMA-gelatina poderão vir a ser aplicados como *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo (97).

6.2.2. Ácido polilático-co-glicólico

O uso de PLGA para aplicações biomédicas tem sido muito investigado devido à sua biocompatibilidade, possibilidade de ajuste da taxa de biodegradação através da alteração da proporção de copolímeros, e devido à possibilidade de modificação das propriedades de superfície de modo a estabelecer melhor interação com o organismo (100). Em termos de aplicações, o PLGA é o polímero sintético mais frequentemente usado para regeneração óssea, podendo ser desenvolvido sob a forma de *scaffolds*, revestimentos, fibras ou microesferas (101).

Lin et al. sintetizaram e caracterizaram hidrogéis compósitos de PLGA-g-PEG contendo diferentes concentrações de hidroxiapatite e avaliaram o efeito desta sobre as propriedades mecânicas, temperatura de transição de fase e pH do hidrogel. A temperatura de transição vítrea obtida foi de 37 °C, sendo que abaixo de 37 °C encontra-se líquido e a esta temperatura ocorre a formação do hidrogel (figura 6.11). Esta propriedade é vantajosa para a sua aplicação em engenharia de tecidos uma vez que este poderá ser injetado sob a forma de solução e formará o hidrogel em contacto com a temperatura corporal (102).

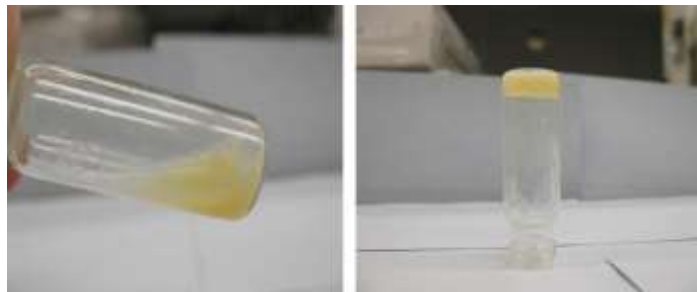


Figura 6.11- -Hidrogel compósito de PLGA-g-PEG contendo 10% de hidroxiapatite líquido a 4 °C e em forma de gel a 37 °C. Reproduzido de (102).

Em relação à hidroxiapatite esta corresponde a um material cerâmico bioativo com estrutura química semelhante à componente inorgânica da matriz óssea (91,102).

A associação da hidroxiapatite ao hidrogel mostrou-se vantajosa para aplicações a nível da regeneração óssea uma vez que esta não apresentou toxicidade, possui bioatividade, biocompatibilidade, osteocondutividade e potencial osteoindutividade. Além disso, não só não altera a temperatura de transição de fase do hidrogel, como neutraliza o ambiente ácido do hidrogel (100,102).

Noutro estudo foi igualmente preparado um hidrogel composto por PLGA e PEG. Yan et al. desenvolveram um hidrogel termo-sensível de PLGA-PEG-PLGA carregado com sinvastatina com vista a ser aplicado em regeneração de tecido ósseo (103). Os autores escolheram este fármaco por apresentar efeito a nível da diferenciação e mineralização dos osteoblastos, tendo um efeito positivo na formação de tecido ósseo (104,105).

Foram sintetizados hidrogéis de PLGA-PEG-PLGA com e sem sinvastatina e realizados estudos in vitro e in vivo, usando uma linhagem celular de osteoblastos derivados de ratinho (MC3T3-E1). Para a realização dos estudos in vivo os hidrogéis foram injetados em defeitos femorais de ratos Wistar. Foi observada proliferação e diferenciação celular nos hidrogéis, verificando-se maior mineralização e expressão do gene osteogénico no caso do hidrogel contendo sinvastatina. Em relação aos estudos in vivo, na figura 6.12 é possível visualizar imagens histológicas das tíbias dos ratos Wistar, coradas com eosina e hematoxilina, após 4 semanas da injeção dos hidrogéis (103).

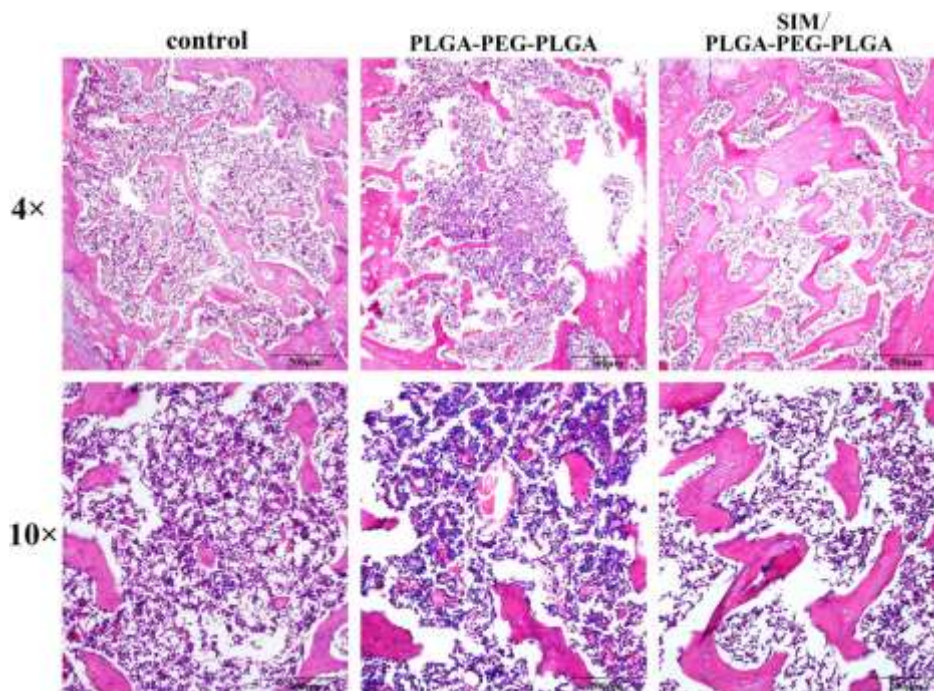


Figura 6.12-Imagens histológicas dos defeitos tíbias, coradas com eosina e hematoxilina, sem preenchimento (controlo), preenchidos com o hidrogel de PLGA-PEG-PLGA e preenchidos com hidrogel de PLGA-PEG-PLGA contendo sinvastatina (SIM/PLGA-PEG-PLGA) quatro semanas após a injeção. Reproduzido de (103).

Verificou-se maior formação de novo osso nos defeitos tibiais injetados com hidrogel de PLGA-PEG-PLGA contendo sinvastatina, comparativamente ao hidrogel sem sinvastatina e ao controle. Deste modo, os resultados obtidos mostraram que a aplicação de hidrogéis de PLGA-PEG-PLGA contendo sinvastatina poderá constituir uma alternativa terapêutica para regeneração de tecido ósseo (103).

6.2.3. Poli (etilenoglicol)

Ao longo do tempo os hidrogéis PEG têm sido amplamente usados em aplicações biomédicas, tanto como *scaffolds* para o desenvolvimento de novos tecidos, como matrizes para libertação controlada de biomoléculas (52).

Dahlin et al. avaliaram a fixação celular inicial e a viabilidade de hidrogéis de PEG modificados com arginina-glicina-ácido aspártico num modelo *in vitro*. Foram usados fibroblastos de origem humana para testar a influência da modificação de algumas propriedades físico-químicas dos hidrogéis e da modificação dos hidrogéis com arginina-glicina-ácido aspártico na adesão e sobrevivência celular (106). O péptido arginina-glicina-ácido aspártico corresponde a um péptido de adesão bastante investigado que se encontra presente nos domínios de ligação celular de proteínas existentes na matriz extracelular. As integrinas presentes na superfície das células ligam-se a este péptido e assim permitem a adesão das células a superfícies por si só não adesivas (107). Neste estudo foram usados seis hidrogéis de PEG com diferentes modificações físico-químicas. Foram usados hidrogéis com três tempos de degradação *in vitro* diferentes (28, 60 e 120 dias), com ou sem adição da sequência de arginina-glicina-ácido aspártico. A viabilidade celular foi determinada através da medição da concentração da enzima lactato desidrogenase (LDH), um marcador de rutura da membrana celular. Após 24 horas de cultura foi possível visualizar o desenvolvimento celular nos vários hidrogéis, associado a baixo valor de LDH, sendo possível inferir que estes hidrogéis não apresentam efeitos tóxicos agudos. Passado 13 dias do início do estudo foi visualizada uma diminuição do número de células em todos os hidrogéis estudados, sendo que os hidrogéis com um tempo de degradação de 60 dias demonstraram um valor de LDH superior ao dos restantes. Em conclusão, todas as formulações de PEG estudadas demonstraram um comportamento semelhante, exceto as formulações com taxa de degradação de 60 dias. Estes dados permitem inferir a possibilidade de aplicação de hidrogéis de PEG para

regeneração óssea guiada sendo, no entanto, necessária otimização a nível do tempo de degradação do hidrogel (106).

Para além das aplicações já descritas os hidrogéis de PEG poderá ser conjugado com outros polímeros como é o caso do ácido hialurónico. Skaalure et al. desenvolveram uma rede polimérica semi-interpenetrante (semi-IPN) constituída por PEG reticulado e cadeias lineares de ácido hialurónico que demonstrou ser uma alternativa promissora para engenharia de tecido cartilaginoso (108).

6.2.4. Álcool polivinílico

Podem ser obtidos hidrogéis de PVA através de reticulação física ou reticulação química. No caso da reticulação química, podem ser usados como agentes reticulantes o glutaraldeído, o metanol, o etanol, o propranolol e a acetona. A reticulação química é um processo eficiente e de baixo custo, no entanto terá que ser tida em conta a possibilidade destas substâncias químicas apresentarem alguma citotoxicidade. No caso da reticulação física podem-se obter hidrogéis por ciclos repetidos de congelamento-descongelamento ou por secagem. Os hidrogéis obtidos por estes métodos apresentam melhor compatibilidade e são termicamente reversíveis (58,109). Num estudo realizado por Kobayashi et al. foi desenvolvido um menisco artificial utilizando um hidrogel de PVA, com conteúdo em água de 90%, sendo implantado em coelhos e avaliados os resultados clínicos após dois anos (110). Na figura 6.13 encontram-se apresentadas imagens microscópicas de cortes histológicos do côndilo femoral e da tíbia, podendo visualizar-se o desenvolvimento da cartilagem articular no final do estudo, no grupo controlo e no grupo onde foi implantado o hidrogel desenvolvido.

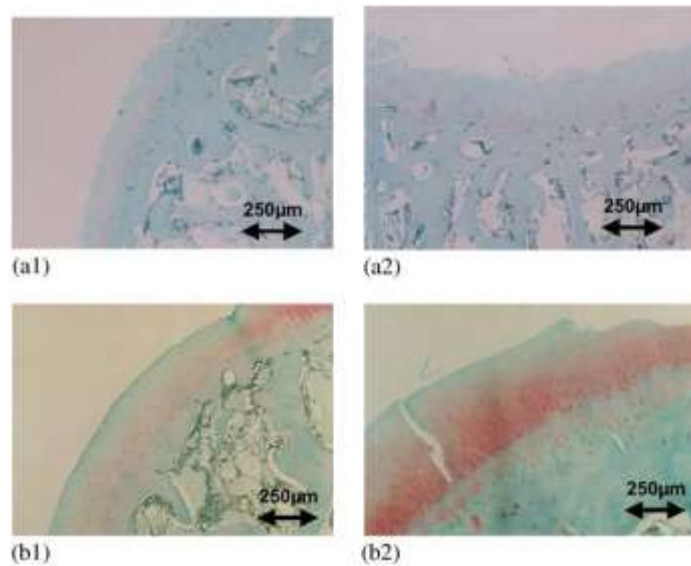


Figura 6.13- Aparência histológica da cartilagem articular do joelho dois anos após a operação. (A) Grupo controlo; (B) Grupo com menisco artificial. 1. Superfície do côndilo femoral; 2. Superfície da tibia. Reproduzido de (110).

No caso em que foi implantado o menisco artificial a cartilagem articular apresentou condições satisfatórias comparativamente com a cartilagem do grupo controlo. Os resultados indicaram que o hidrogel de PVA com elevado conteúdo em água têm uma excelente função a nível do menisco, semelhante à do menisco humano. Durante os dois anos de estudo as propriedades mecânicas do hidrogel mantiveram-se, não sendo observada degradação nem fratura do hidrogel. Estes resultados demonstram que os hidrogéis de PVA têm durabilidade suficiente para esta função podendo ser uma solução viável para substituição do menisco (110).

Os hidrogéis de PVA também poderão vir a ser aplicados para a regeneração de tecido vascular. Com vista a esta aplicação Alexandre et al. realizaram um estudo de modo a avaliar a biocompatibilidade e hemocompatibilidade dos hidrogéis de PVA. Para tal, foram preparados hidrogéis de PVA isoladamente e hidrogéis de PVA copolimerizados com dextrano e realizados testes *in vitro* e *in vivo* (111). A escolha do dextrano deve-se ao facto deste polímero apresentar alguns efeitos a nível da homeostasia do coagulação sanguíneo (112).

Foram usadas células estaminais mesenquimais humanas, previamente isoladas do cordão umbilical. Para a realização dos testes de hemocompatibilidade *in vitro* foi quantificado o índice de hemólise. Os hidrogéis testados demonstraram baixo índice de hemólise, não sendo considerados hemolíticos. Para além disso verificou-se que o hidrogel de PVA e dextrano apresenta menor índice comparativamente aos restantes.

Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos

Para a realização dos estudos *in vivo* foram usadas trinta ovelhas Merino fêmeas adultas sendo divididas em cinco grupos. Nos animais do grupo 1 foi implantado, por via subcutânea, um hidrogel de PVA, no grupo 2 foi implantado um hidrogel de PVA coberto com uma monocultura de células estaminais mesenquimais humanas e no grupo 3 foi implantado o hidrogel composto por PVA e dextrano. O grupo 4 e grupo 5 funcionaram como controlo negativo e positivo, respetivamente. De modo a avaliar a evolução dos materiais implantados e a resposta do organismo aos mesmos, foram recolhidas amostras dos implantes e dos tecidos circundantes 1, 2, 4, 8, 16, e 32 semanas após implantação. Através da análise de vários parâmetros de resposta biológica os autores verificaram que a implantação do hidrogel de PVA originou uma pequena reação do organismo sendo considerado ligeiramente irritante, sendo, no entanto, esta reação menor no caso do hidrogel de PVA e dextrano e no caso do hidrogel de PVA ao qual foram adicionadas as células estaminais mesenquimais de origem humana. Nestes grupos verificou-se também a formação de novos vasos sanguíneos junto aos implantes demonstrando biocompatibilidade dos mesmos. Com este estudo foi possível concluir que os hidrogéis de PVA apresentam biocompatibilidade e hemocompatibilidade, possuindo potencialidade para vir a ser usados como biomaterial para regeneração de tecido vascular (111).

7. Conclusão

A área de engenharia de tecidos desenvolveu-se de modo a compensar a inexistência de órgãos e tecidos em número suficiente para se realizarem todos os transplantes atualmente necessários. Um dos pontos críticos desta estratégia é a escolha e desenvolvimento dos *scaffolds*. Estes suportes devem assemelhar-se o mais possível à membrana extracelular de forma a mimetizá-la, sendo essencial a adequação das características destes de acordo com o local onde serão implantados ou injetados e a função e/ou órgãos que irão recuperar.

Dentro dos biomateriais existentes, os polímeros apresentam vantagens relativamente aos restantes, sendo os mais usados. Tem sido investigada a aplicação tanto de polímeros naturais como de polímeros sintéticos.

A partir destes são obtidas estruturas tridimensionais em forma de rede com elevada capacidade de retenção de água, os hidrogéis. Estes têm sido bastante investigados nesta área devido às suas propriedades físico-químicas favoráveis, às suas semelhanças com a matriz extracelular e à sua flexibilidade para modificações. A fraca resistência mecânica e a possível citotoxicidade de alguns hidrogéis têm sido apontadas como as principais desvantagens destes biomateriais, sendo necessária a otimização destas características. Algumas das estratégias possíveis para conduzir a essa otimização são a combinação de diferentes polímeros, alterações nas concentrações de polímeros usados, no tipo de agentes ou na densidade de reticulação ou modificações de grupos funcionais.

Apesar de alguns estudos já realizados apresentarem bons resultados é necessária maior investigação nesta área, a nível de estudos celulares e fisiológicos de modo a ultrapassar algumas limitações e possibilitar a aplicação dos produtos da engenharia de tecidos como opções terapêuticas na prática clínica.

8. Bibliografia

1. Commission of the european Communities. Organ Donation and Transplantation : Policy Actions at EU Level. 2007.
2. Instituto Português do Sangue e Transplantação, IP [Internet]. [citado a 2 de abril de 2016]. Disponível em: <http://ipst.pt/>
3. Blitterswijk C Van, Moroni L, Rouwkema J, Sidappa R, Sohier J. Tissue engineering – an introduction. In: Tissue Engineering. 2008. p. xii – xxxvi.
4. Vacanti JP, Vacanti CA. The History and Scope of Tissue Engineering. In: Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition. 2013. p. 3–8.
5. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Ciência e Tecnol.* 2005;15(February):13–21.
6. El-Sherbiny I, Yacoub M. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013;2013(3):316–42.
7. Glossary of Terms. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering [Internet]. [citado a 3 de abril de 2016]. Disponível em: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/glossary>
8. Patel N, Gohil P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *Int J Emerg Technol Adv Eng.* 2012;2(4):91–101.
9. Ahadian S, Sadeghian RB, Salehi S, Ostrovidov S, Bae H, Ramalingam M, et al. Bioconjugated Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Bioconjug Chem.* 2015;26(10):1984–2001.
10. Slaughter B V., Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas N a. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater.* 2009;21:3307–29.
11. Yahia LH, Chirani N, Gritsch L, Motta FL, Natta CG. History and Applications of Hydrogels. *iMedPub Journals.* 2015;4(2:13):1–23.
12. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14(3):88–95.
13. Martínez-Pérez C, Olivas-Armendariz I, Castro-Carmona JS, García-Casillas PE. Scaffolds for tissue engineering via thermally induced phase separation. In: *Advances in Regenerative Medicine.* 2011. p. 275–94.
14. Barbanti SH, Zavaglia CAC, Duek EAR. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Ciência e Tecnol.* 2005;15:13–21.
15. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* 2008;17(SUPPL. 4).
16. Ricotti L, Ciofani G, Mattoli V, Menciassi A. Nano-Doped Matrices for Tissue Regeneration. In: *Advances in Regenerative Medicine.* 2011. p. 295–318.
17. Buwalda SJ, Boere KWM, Dijkstra PJ, Feijen J, Vermonden T, Hennink WE. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J Control Release.* 2014;190:254–73.
18. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C.* 2015;57:414–33.
19. Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res.* 2015;6(2):105–21.
20. Sperling LH. Interpenetrating Polymer Networks : An Overview. *Mater Sci.* 1994;3–38.
21. Lohani A, Singh G, Bhattacharya SS, Verma A. Interpenetrating polymer networks as innovative drug delivery systems. *J Drug Deliv.* 2014;1–11.
22. Institut fur Verbundwerkstoffe. Projects TechNaTex.

23. Ebara M, Kotsuchibashi Y, Narain R, Idota N, Kim Y-J, Hoffman JM, et al. *Smart Biomaterials*. 2014.
24. Aouada AF, Mattoso LHC. Hidrogéis Biodegradáveis: uma opção na aplicação como veículos carreadores de sistemas de liberação controlada de pesticidas. *Bol Pesqui e Desenvol*. 2009;28:32.
25. Peppas N. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm*. 2000;50:27–46.
26. Santin M, Regeneration A, Sciences B, Kingdom U, Bioengineering T, Dubruel P, et al. *European Society for Biomaterials*. 2013;6–7.
27. Parida P, Behera A, Mishra SC. Classification of Biomaterials used in Medicine. *Int J Adv Appl Sci*. 2012;1(3):125–9.
28. Yadav P, Yadav H, Shah VG, Shah G, Dhaka G. Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. *J Clin Diagnostic Res*. 2015;9(9):21–5.
29. Chen Q, Liang S, Thouas GA. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Prog Polym Sci*. 2013;38(3-4):584–671.
30. Willerth S, Sakiyama-Elbert S. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. *StemBook*. 2008;(314):1–18.
31. Cheung HY, Lau KT, Lu TP, Hui D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Compos Part B Eng*. 2007;38(3):291–300.
32. Sivashanmugam A, Arun Kumar R, Vishnu Priya M, Nair S V., Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur Polym J*. 2015;72:543–65.
33. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64:18–23.
34. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *J Pharm Pharm Sci*. 2015;18(1):53–60.
35. Highley CB, Prestwich GD, Burdick JA. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:35–40.
36. Laranjeira MCM, De Fávère VT. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim Nova*. 2009;32(3):672–8.
37. Synowiecki J, Al-Khateeb NA. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):145–71.
38. Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs*. 2015;13:1133–74.
39. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci*. 2009;34(7):641–78.
40. Bhavani AL, Nisha J. Dextran - The polysaccharide with versatile uses. *Int J Pharma Bio Sci*. 2010;1(4):569–73.
41. Jung B, Theato P. Functional Polymers Based on Dextran. *Adv Polym Sci*. 2006;(May 2012):1–34.
42. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37(1):106–26.
43. Silvipriya KS, Krishna Kumar K, Bhat AR, Dinesh Kumar B, John A, Lakshmanan P. Collagen: Animal sources and biomedical application. *J Appl Pharm Sci*. 2015;5(3):123–7.
44. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(12):1531–46.

45. Mariod AA, Adam HF. Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2013;12(2):135–47.
46. Yeh MK, Liang YM, Cheng KM, Dai NT, Liu CC, Young JJ. A novel cell support membrane for skin tissue engineering: Gelatin film cross-linked with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide. *Polymer (Guildf)*. 2011;52(4):996–1003.
47. Weisel JW. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys Chem*. 2004;112:267–76.
48. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2012;49(12):832–64.
49. Pillai O, Panchagnula R. Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*. 2001;5:447–51.
50. Wang Y, Cai LQ, Nugraha B, Gao Y, Leo HL. Current hydrogel solutions for repairing and regeneration of complex tissues. *Curr Med Chem*. 2014;21(22):2480–96.
51. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym Degrad Stab*. 2010;95:2126–46.
52. Lin CC, Anseth KS. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res*. 2009;26(3):631–43.
53. Zhu J. Biomimetic Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering. *J Biochips Tissue Chips*. 2012;02(03):1–2.
54. Batista CM, Carvalho CMB De, Magalhães NSS. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm*. 2007;43(2):167–79.
55. Papavasiliou G, Sokic S, Turturro M. Synthetic PEG Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for Tissue Engineering Applications. *Intechopen*. 2012;111–34.
56. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011;8(5):607–26.
57. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem Rev*. 2001;101(7):1869–79.
58. Nkhwa S, Lauriaga KF, Kemal E, Deb S. Poly(vinyl alcohol): Physical Approaches to Designing Biomaterials for Biomedical Applications. *Conf Pap Sci*. 2014;1–7.
59. Baker MI, Walsh SP, Schwartz Z, Boyan BD. A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2012;9999B:1–7.
60. Peppas NA, Huang Y, Torres-Lugo M, Ward JH, Zhang J. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. 2002;9–29.
61. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(SUPPL.):18–23.
62. Levengood SL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. 2014;2(21):3161–84.
63. Rubert M, Alonso-Sande M, Monjo M, Ramis JM. Evaluation of Alginate and Hyaluronic Acid for Their Use in Bone Tissue Engineering. *Biointerphases*. 2012;7(1-4):1–11.
64. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008;89(5):338–44.
65. Gaspar A, Moldovan L, Constantin D, Stanciuc AM, Sarbu Boeti PM, Efrimescu IC. Collagen-based scaffolds for skin tissue engineering. *J Med Life*. 2011;4(2):172–7.

66. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012;8(9):3191–200.
67. Dong C, Lv Y. Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers (Basel).* 2016;8(42):1–20.
68. Zhao X, Lang Q, Yildirim L, Lin ZY, Cui W, Annabi N, et al. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(1):108–18.
69. Shevchenko R V, James SL, James SE. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface.* 2010;7:229–58.
70. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:207–33.
71. Helary C, Zarka M, Giraud-Guille MM. Fibroblasts within concentrated collagen hydrogels favour chronic skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6:225–37.
72. Ma X, He Z, Han F, Zhong Z, Chen L, Li B. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;143:81–7.
73. Xiao X, Pan S, Liu X, Zhu X, Connon CJ, Wu J, et al. In vivo study of the biocompatibility of a novel compressed collagen hydrogel scaffold for artificial corneas. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(6):1782–7.
74. McCain ML, Agarwal A, Nesmith HW, Nesmith AP, Parker KK. Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues. *Biomaterials.* 2014;35(21):5462–71.
75. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydr Polym.* 2013;92(2):1262–79.
76. Erickson IE, Kestle SR, Zellars KH, Farrell MJ, Kim M, Burdick JA, et al. High Mesenchymal Stem Cell Seeding Densities in Hyaluronic Acid Hydrogels Produce Engineered Cartilage with Native Tissue Properties. *Acta Biomater.* 2012;8(8):3027–34.
77. Bian S, He M, Sui J, Cai H, Sun Y, Liang J, et al. The self-crosslinking smart hyaluronic acid hydrogels as injectable three-dimensional scaffolds for cells culture. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;140:392–402.
78. Tan H, Rubin JP, Marra KG. Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for adipose tissue regeneration. 2010;(September):173–80.
79. Straccia MC, Romano I, Oliva A, Laurienzo P, Pathology G. Alginate Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing. *Mar Drugs.* 2015;13:2890–908.
80. Zhao L, Weir MD, Xu HHK. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. 2010;31(25):6502–10.
81. Dahlmann J, Krause A, Moller L, Kensah G, Mowes M, Diekmann A, et al. Fully defined in situ cross-linkable alginate and hyaluronic acid hydrogels for myocardial tissue engineering. *Biomaterials.* 2013;34:940–51.
82. Weir MD, Xu HHK. Osteoblastic Induction on Calcium Phosphate Cement-Chitosan Constructs for Bone Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res.* 2010;94(1):223–33.
83. Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Black CR, Wells JA, Roberts CA, et al. In vivo assessment of bone regeneration in alginate/bone ECM hydrogels with incorporated skeletal stem cells and single growth factors. *PLoS One.*

- 2015;10(12):1–24.
84. Haleem AM, Chu CR. Advances in tissue engineering techniques for articular cartilage repair. *Oper Tech Orthop*. 2010;20:76–89.
 85. Selmi T, Verdonk P, Chambat P, Dubrana F, Potel J, Barnouin L, et al. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel. *J Bone Jt Surg*. 2008;90-B(5):597–604.
 86. Stein S, Strauss E, Bosco III J. Advances in the Surgical Management of Articular Cartilage Defects : Autologous Chondrocyte Implantation Techniques in the Pipeline. *Cartilage*. 2013;4(1):12–9.
 87. Shive MS, Stanish WD, McCormack R, Forriol F, Mohtadi N, Pelet S, et al. BST-CarGel® Treatment Maintains Cartilage Repair Superiority over Microfracture at 5 Years in a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Cartilage*. 2015;6(2):62–72.
 88. Tan H, Chu CR, Payne K, Marra KG. Injectable In Situ Forming Biodegradable Chitosan-Hyaluronic acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. 2009;30(13):2499–506.
 89. Hashimoto Y, Nakamura T, Kuremoto K, Notazawa S, Nakahara T. Development of beta tricalcium Phosphate/Collagen Sponge Composite for Bone Regeneration. *Dent Mater J*. 2006;25(1):138–44.
 90. Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, Selvamurugan N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *J Nanobiotechnology*. 2015;13(40):1–13.
 91. Zhou H, Lee J. Nanoscale Hydroxyapatite Particles for Bone Tissue Engineering. *Acta Biomater*. 2011;7:2769–81.
 92. Hadley KB, Newman SM, Hunt JR. Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation , matrix maturation , and mineralization in the long bones of growing rats. *J Nutr Biochem*. 2010;21:297–303.
 93. Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering. 2011;31(14):3976–85.
 94. Lisková J, Bačáková L, Skwarczyńska AL, Musial O, Bliznuk V, Schamphelaere K De, et al. Development of Thermosensitive Hydrogels of Chitosan , Sodium and Magnesium Glycerophosphate for Bone Regeneration Applications. *J Funct Biomater*. 2015;6:192–203.
 95. Wang H, Shi J, Wang Y, Yin Y, Wang L, Liu J, et al. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. *Biomaterials*. 2014;35(13):3986–98.
 96. Zhang L, Zheng GJ, Guo YT, Zhou L, Du J, He H. Preparation of novel biodegradable pHEMA hydrogel for a tissue engineering scaffold by microwave-assisted polymerization. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7(2):136–40.
 97. Cetin D, Kahraman a S, Gumusderelioglu M. Novel Scaffolds Based on Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Superporous Hydrogels for Bone Tissue Engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011;22:1157–78.
 98. Atzet S, Curtin S, Trinh P, Bryant S, Ratner B. Degradable poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-co-polycaprolactone hidrogels for tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules*. 2008;9(12):3370–7.
 99. Cetin D, Kahraman AS, Gumusderelioglu M. Novel pHEMA-gelatin SPHs as bone scaffolds in dynamic cultures. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23:2803–12.
 100. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton P V. An overview of poly(lactic-co-

- glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci.* 2014;15(3):3640–59.
101. Félix Lanao RP, Jonker AM, Wolke JGC, Jansen J a, van Hest JCM, Leeuwenburgh SCG. Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(4):380–90.
 102. Lin G, Cosimbescu L, Karin NJ, Tarasevich BJ. Injectable and thermosensitive PLGA-g-PEG hydrogels containing hydroxyapatite: preparation, characterization and in vitro release behavior. *Biomed Mater.* 2012;7(2):1–10.
 103. Yan Q, Xiao LQ, Tan L, Sun W, Wu T, Chen LW, et al. Controlled release of simvastatin-loaded thermo-sensitive PLGA-PEG-PLGA hydrogel for bone tissue regeneration: In vitro and in vivo characteristics. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2015;103(11):3580–9.
 104. Walter MS, Frank MJ, Rubert M, Monjo M, Lyngstadaas SP, Haugen HJ. Simvastatin-activated implant surface promotes osteoblast differentiation in vitro. *J Biomater Appl.* 2014;28(6):897–908.
 105. Yang F, Zhao SF, Zhang F, He FM, Yang GL. Simvastatin-loaded porous implant surfaces stimulate preosteoblasts differentiation: An in vitro study. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2011;111:551–6.
 106. Dahlin C, Johansson A, Hoffman M, Molenberg A. Early biocompatibility of poly (ethylene glycol) hydrogel barrier materials for guided bone regeneration. An in vitro study using human gingival fibroblasts (HGF-1). *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:16–20.
 107. Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2002;23(22):4315–23.
 108. Skaalure SC, Dimson SO, Pennington AM, Bryant SJ. Semi-interpenetrating networks of hyaluronic acid in degradable PEG hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 2014;10(8):3409–20.
 109. Paradossi G, Cavalieri F, Chiessi E, Spagnoli C, Cowman MK. Poly(vinyl alcohol) as versatile biomaterial for potential biomedical applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14:687–91.
 110. Kobayashi M, Chang YS, Oka M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials.* 2005;26(16):3243–8.
 111. Alexandre N, Ribeiro J, Gartner A, Pereira T, Amorim I, Fragoso J, et al. Biocompatibility and hemocompatibility of polyvinyl alcohol hydrogel used for vascular grafting - In vitro and in vivo studies. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(A):4262–75.
 112. Zeerleder S, Mauron T, Lämmle B, Wuillemin WA. Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thromb Res.* 2002;105:441–6.