

Resumo

O conceito actual de medicina regenerativa do osso apela para a necessidade de novas matrizes de sustentação que, para além de serem biocompatíveis e bioreabsorvíveis, apresentem analogia estrutural com a matriz extracelular, e sejam capazes de funcionar como veículo de moléculas de sinalização celular e de células autólogas osteoprogenitoras. Entre outras propriedades, estes suportes deverão permitir a adesão, a divisão, assim como a diferenciação osteogénica de células osteoprecursoras, permitir uma rápida vascularização, e incentivar a formação do osso. As características da superfície tem uma importância preponderante nas interacções célula-material. A química da superfície, em particular, influencia a adesão dos osteoblastos, a sua morfologia, e a sua expressão fenotípica, por influenciar a adsorção e a conformação de glicoproteínas envolvidas no processo de adesão celular.

A primeira parte desta tese visou a investigação do efeito do grau de acetilação (GA) na aptidão das matrizes de quitosano para promoverem a adesão, a proliferação, e a diferenciação osteogénica de células osteoprecursoras, *in vitro*. Para este fim, prepararam-se e caracterizaram-se lotes de quitosano com GAs numa gama de 4 a 49%. Numa fase inicial, utilizaram-se células osteoblásticas humanas a fim de estudar o efeito do GA na adesão, morfologia, e proliferação de células osteogénicas a curto prazo em filmes de quitosano. O GA influenciou fortemente a adesão celular, sendo a adesão celular favorecida por GAs baixos. Para além deste facto, verificou-se um efeito marcante do GA na morfologia das células assim como na organização do respectivo citoesqueleto, já que só se observaram células espalhadas e com citoesqueleto organizado em filmes de GAs ≤ 13%. A cinética de proliferação celular também foi influenciada pelo GA, sendo favorecida em filmes com um GA de 4%.

Perante os resultados obtidos, procedeu-se ao estudo do efeito do GA na adesão e diferenciação osteogénica de células osteoprecursoras em filmes de quitosano, tendo-se utilizado para o efeito células estromais de medula óssea de rato. Verificou-se uma tendência para valores mais altos de adesão celular com a diminuição do GA, tal como previamente observado para células osteoblásticas. Para além deste facto, com o tempo, a organização do citoesqueleto, a proliferação, e a diferenciação osteogénica só foram possíveis em filmes de quitosano com um GA de 4%, tendo-se verificado uma ausência de proliferação celular em filmes com GAs ≥ 13%. Como os filmes com um GA de 4% foram os que revelaram valores superiores de adsorção de fibronectina a partir do soro, sugere-se que a adesão, a organização do citoesqueleto, e a diferenciação osteogénica de células estromais de medula óssea de rato em quitosano na presença de soro sejam mediadas pela camada de fibronectina adsorvida à superfície.

Subsequentemente, investigou-se o efeito do GA na aptidão de esponjas de quitosano para sustentarem a adesão, a organização do citoesqueleto, a actividade, e a proliferação de células osteogénicas, utilizando para o efeito células osteoblásticas humanas. Mais uma vez, a adopção de uma morfologia espalhada e a organização do citoesqueleto só se verificaram para GAs ≤ 13%, o que sugere uma adsorção maior de glicoproteínas a estes substratos.

Em síntese, os três estudos realizados revelaram que para além de no caso de células osteoblásticas, a organização do citoesqueleto em matrizes de quitosano só ser possível para GAs ≤ 13%, no caso de células estromais de medula óssea de rato

cultivadas em filmes de quitosano, a proliferação, a organização do citoesqueleto, e a diferenciação osteogénica só se verificam para GAs inferiores a este.

Na segunda parte desta tese, pretendeu-se melhorar as propriedades osteocondutoras das matrizes de quitosano, induzindo nestas a deposição de uma camada de apatite. Para este efeito, tentou-se a fosforilação de membranas de quitosano, utilizando o sistema reactivo $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{hexanol}$, a 30°C , com ligeiras modificações, como alternativa ao método de fosforilação $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{ureia}/\text{DMF}$, que implica o uso de temperaturas mais elevadas. A análise de superfícies por XPS, ATR-FTIR, e medição de ângulos de contacto estáticos revelou um aumento do teor de fosfatos, com a duração da reacção. Para além deste facto, a análise por EDS de cortes transversais revelou que a fosforilação também ocorreu na parte interna das membranas, embora a um nível mais reduzido.

Seguidamente, investigou-se a aptidão das membranas de quitosano fosforiladas para nuclear fosfatos de cálcio, em condições similares às fisiológicas. A incubação das membranas fosforiladas numa solução de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ levou à formação de uma camada mineral de fosfatos de cálcio, sobre toda a sua superfície. A imersão subsequente em "Simulated Body Fluid" (SBF) resultou no crescimento de uma estrutura mineral porosa, composta por uma apatite pouco cristalina e parcialmente carbonatada.

Por último, as membranas de quitosano fosforiladas por um período de 8 horas foram avaliadas em termos de citotoxicidade para células humanas osteoblásticas, não se tendo verificado efeito algum citotóxico.

Em resumo, estes estudos revelaram que o sistema reactivo $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{butanol}$ é eficiente para a fosforilação de membranas de quitosano. As membranas de quitosano fosforiladas por um período de 8 horas não revelaram citotoxicidade para células osteoblásticas, e o seu sal de cálcio foi capaz de induzir a deposição de uma camada apatítica em SBF, o que permite a realização de mais ensaios biológicos, nomeadamente a avaliação de membranas de quitosano mineralizadas como substrato para a diferenciação osteogénica de células osteoprecursoras.

Abstract

Current concepts of bone regenerative medicine emphasize the need for new biocompatible and bioresorbable support matrices, structurally mimicking the extracellular matrix, capable of acting as vehicles for autologous osteoprogenitor cells as well as of cell signaling molecules. Among others features, scaffolds are expected to allow anchorage, division, and differentiation of osteoprecursor cells along the osteogenic lineage, support rapid vascular ingrowth, and encourage osteoconduction with host bone. The surface properties play a major role in cell-material interactions.

Surface chemistry, particularly, affects osteoblast adhesion, spreading and phenotypic expression, by influencing the adsorption and the conformation of glycoproteins involved in the cell adhesion process.

In the first part of this thesis, the research purpose was to investigate the effect of the degree of acetylation (DA) on the ability of chitosan matrices to promote cell anchorage, proliferation, and osteogenic differentiation of osteoprecursor cells, *in vitro*. For that

purpose, chitosan samples with DAs in the range of 4 to 49% were prepared and characterized.

In a preliminary study, human osteoblastic cells were used to study the DA effect on cell adhesion, spreading, and short-term proliferation of osteogenic cells on chitosan films. The DA strongly influenced cell adhesion, lower DAs favoring cell adhesion.

In addition, a marked effect on cell morphology and cytoskeleton organization was observed, cell spreading and cytoskeleton organization being only observed on films with DAs $\leq$ 13%. Moreover, the DA also influenced cell growth kinetics, cell proliferation being favored on films with a DA of 4%.

In view of the previous findings, the DA effect on cell adhesion and osteogenic differentiation of osteoprecursor cells on chitosan films was investigated, using rat bone marrow stromal cells (rBMSCs). A tendency to higher cell attachment levels on decreasing the DA was found, following the trend observed with osteoblastic cells. In addition, in time, cell cytoskeleton organization, proliferation, and osteogenic differentiation were only possible on chitosan films with a DA of 4%, while for DAs $\geq$ 13% cell growth was impaired. As chitosan sample with a DA of 4% showed the highest fibronectin adsorption from serum, it is suggested that cell adhesion, cytoskeleton organization and osteogenic differentiation of rBMSCs on chitosan in the presence of serum may be mediated by the adsorbed layer of fibronectin.

Subsequently, the effect of the DA on the ability of chitosan porous scaffolds to support cell anchorage, cytoskeleton organization, activity, and proliferation of osteogenic cells, was investigated, using osteoblastic cells. Once more, cell spreading and cytoskeleton organization were only observed for DAs $\leq$ 13%, indicating a higher adsorption of cell adhesion glycoproteins on these substrates.

Taken together, the three studies performed revealed that DAs $\leq$ 13% are required for cytoskeleton organization of osteoblastic cells on chitosan films and porous scaffolds *in vitro*, and that DAs lower than 13% are required for proliferation, cytoskeleton organization and osteogenic differentiation of rBMSCs on chitosan films.

The research purpose of the second part of this thesis was to enhance the osteoconductive properties of chitosan matrices, by inducing the deposition of an apatite-like layer. For this purpose, phosphorylation of chitosan membranes was attempted, by using the $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{hexanol}$ reaction route, carried out at 30°C, with minor modifications, as an alternative to the phosphoric acid/urea/DMF phosphorylation method, which involves the use of much higher temperatures.

Surface analysis by XPS, ATR-FTIR, and static contact angle measurements revealed an increase of the phosphate content with the reaction time. Moreover, EDS analysis of the cross-sections revealed that phosphorylation also occurred in the inner of the membrane, although at a lower extent.

Subsequently, the ability of the resulting phosphorylated chitosan (P-chitosan) membranes to nucleate calcium phosphates under simulated physiologic conditions was investigated. The incubation in $\text{Ca}(\text{OH})_2$ solution led to the formation of a calcium phosphate mineral layer all over the surface of P-chitosan membranes. The subsequent immersion in Simulated Body Fluid (SBF) led to the growth of a multilayered porous mineral structure composed of partially carbonated and poorly crystalline apatite.

Finally, 8-hours phosphorylated chitosan membranes were evaluated regarding cytotoxicity towards human osteoblastic cells, no cytotoxic effect being observed.

In conclusion, the studies performed revealed that the $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5/\text{butanol}$ reaction system is effective for the phosphorylation of chitosan membranes. 8-hours phosphorylated membranes were not cytotoxic towards osteoblastic cells, and their calcium salt was able to induce the deposition of an apatite-like layer in SBF, thus enabling further biological assays, such as the evaluation of mineralized P-chitosan membranes as substrate for osteogenic differentiation of osteoprecursor cells.