

Resumo

Independentemente do tipo e da aplicação do biomaterial utilizado, uma vez implantado no corpo humano interage com os tecidos. O processo de implantação implica a existência de um ferimento nos tecidos, o que leva à activação de uma reacção fisiológica de cicatrização, que consta de dois componentes essenciais: inflamação e processos de reparação. Os leucócitos são um tipo de células que desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória do hospedeiro e em processos imunológicos; conseqüentemente, a sua resposta à presença de um biomaterial é muito importante para a compreensão das interacções entre o hospedeiro e o biomaterial.

O objectivo da presente tese foi alargar a compreensão da resposta inflamatória a biomateriais. Tendo em conta este objectivo, foram utilizadas monocamadas auto-estruturadas (self-assembled monolayers, SAMs) de alcanotóis em ouro, com os grupos funcionais OH, COOH e CH₃ como superfícies modelo na investigação das interacções entre células inflamatórias e as características químicas da superfície de biomateriais.

No presente trabalho foram realizados estudos *in vitro* e também *in vivo* das interacções entre SAMs e células inflamatórias.

A resposta inflamatória *in vitro* foi investigada através do estudo da adesão de leucócitos humanos mononucleares e polimorfonucleares às superfícies modelo escolhidas. Os resultados indicam que os leucócitos humanos aderem em maior número às superfícies recobertas por grupos metilo, em comparação com as recobertas com grupos hidroxilo e carboxilo. Conclui-se que a pré activação dos leucócitos originou um aumento generalizado da adesão das células às superfícies estudadas.

Os estudos *in vivo* foram realizados utilizando um modelo animal de inflamação que consiste na formação de uma bolsa de ar subcutânea. O estudo foi mais direccionado para a resposta inflamatória aguda inicial. As diferentes superfícies modelo foram implantadas nas bolsas de ar dos animais e subsequentemente, os exsudados inflamatórios e os implantes foram recolhidos e analisados. As superfícies cobertas por grupos metilo atraíram o número mais elevado de leucócitos para as bolsas de ar. Um elevado número de células aderiu às superfícies recobertas por grupos OH e às superfícies de ouro, em comparação com as superfícies recobertas por grupos COOH e CH₃. SAMs recobertas por grupos metilo induzem a migração de um grande número de células inflamatórias para as bolsas de ar, mas estão associados a um baixo número de células aderentes à superfície. Esta ocorrência foi observada 24, 48 e 72 horas após a implantação.

O número de células activadas entre as células inflamatórias recrutadas que expressam a molécula de adesão Mac-1 foram também estudadas. Em animais sem qualquer material implantado, após 24 horas o número de células Mac-1⁺ era baixo. Após a implantação das diferentes SAMs verificou-se um aumento significativo no número destas células. As superfícies

terminadas em grupos metilo induziram um aumento significativo de leucócitos activados. Adicionalmente, os exsudados inflamatórios induzidos por SAMs terminadas em grupos metilo foram examinados 4, 24, 48 e 72 horas após a implantação e revelaram que estas superfícies atraíram um número significativo de fagócitos que expressam a integrina Mac-1.

A fase final da resposta de cicatrização a biomateriais foi investigada através do estudo da formação da cápsula fibrosa uma semana após a implantação. Foi observado um aumento da espessura da cápsula fibrosa observada à volta de implantes recobertos com grupos metilo e também em superfícies de ouro, em comparação com animais sem material implantado e com superfícies cobertas com grupos COOH e OH.

Reunindo os resultados obtidos nas diferentes partes deste estudo, pode dizer-se que as superfícies com grupo terminal CH₃ apresentam o comportamento pró inflamatório mais acentuado de todas as superfícies estudadas, uma vez que são responsáveis pela (i) adesão in vitro do maior número de leucócitos humanos (ii) atracção e activação do maior número de células inflamatórias in vivo e também (iii) pela formação de cápsulas fibrosas mais espessas.

Abstract

Whatever the type and application of the biomaterial used, once it is implanted in the human body, it interfaces with the living tissues. The very act of implantation means that there is tissue trauma, which will lead to a physiological healing reaction, consisting of two essential components: inflammation and repair processes. Leukocytes are a central cell type in directing host inflammatory and immune processes; thus, their response to biomaterials is extremely important in understanding biomaterial-host interaction.

The aim of the present thesis was to advance the understanding of the inflammatory response to biomaterials. In view of this objective, self-assembled monolayers (SAMs) of alkanethiols on gold with the terminal functionalities of OH, COOH and CH₃ were used as model surfaces, to investigate the interactions of inflammatory cells and the surface chemistry of biomaterials.

In the present work, both in vitro and in vivo studies of the interactions of SAMs with inflammatory cells were performed.

The in vitro inflammatory response was investigated by studying the adhesion of human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes to the elected model surfaces. Our results indicate that human leukocytes adhere in greater numbers to methyl-covered surfaces than to hydroxyl and carboxyl-covered ones. It has also been concluded that pre-activation of leukocytes resulted in a general increase of cell adhesion to the surfaces.

The in vivo studies were performed using a rodent air-pouch model of inflammation. The main focus was on the initial acute inflammatory reaction. The different model surfaces were implanted in the mice air-pouches and afterward the inflammatory exudates and implants were

retrieved and analyzed. Methyl-covered surfaces recruited the highest number of leukocytes to the air pouches. Higher numbers of cells adhere to the OH-coated and gold surfaces in comparison with COOH and with CH₃-coated ones. Methyl-covered SAMs induced the migration of large numbers of inflammatory cells into the air pouches but were associated with low numbers of adherent cells on the surface. This phenomenon was observed at 24, 48 and 72 hours after implantation.

The number of activated cells among the recruited inflammatory cells, expressing the adhesion molecule Mac-1 has also been determined. After 24 hours of implantation, in sham-operated animals the number of Mac-1⁺ cells was low, and after the implantation of the different SAMs there was a significant increase in the number of these cells. The methyl-terminated surfaces induced a significant increase in the number of activated leukocytes. In addition, the inflammatory exudates induced by methyl-terminated SAMs were monitored 4, 24, 48 and 72 hours after implantation, and revealed that methyl-terminated surfaces induced a significant recruitment of phagocytes expressing the integrin Mac-1.

The end stage of the healing response to biomaterials was assessed by the study of the fibrous capsule formed one week after implantation. An increase in the thickness of the fibrous capsule was seen around implants coated with methyl groups, and also in gold surfaces, in comparison with sham-operated mice and COOH- and OH-covered surfaces.

Taken together the results obtained in the different parts of this study, indicate that the CH₃-covered surfaces seem to have the highest pro-inflammatory behaviour of the three tested surfaces since they are responsible for (i) the in vitro adhesion of higher numbers of human leukocytes (ii) the in vivo recruitment and activation of larger numbers of inflammatory cells and also (iii) for the formation of thick fibrous capsules.