



**Ana Sara Silva Rodrigues da Costa**

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Suportes Porosos com Topografia de Fibras Alinhadas para a Regeneração Neuronal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Maria Gabriela Rodrigues, Professora Auxiliar, FCUL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Prof. Doutora Maria Gabriela Rodrigues



**Ana Sara Silva Rodrigues da Costa**  
Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

**Suportes Porosos com Topografia de Fibras Alinhadas  
para a Regeneração Neuronal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL  
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL  
Maria Gabriela Rodrigues, Professora Auxiliar, FCUL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca  
Arguente: Prof. Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges  
Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques  
Prof. Doutora Maria Gabriela Rodrigues

Outubro 2012



Copyright© - Todos os direitos reservados. Ana Sara Silva Rodrigues da Costa; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

*Suportes Porosos com Topografia de Fibras Alinhadas para a Regeneração Neuronal*

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



# Agradecimentos

A todos aqueles que contribuíram para a realização do presente trabalho, a vários níveis e em diversos momentos, apresento os meus sinceros agradecimentos.

À Professora Célia Henriques, do GREAT, minha orientadora, pela oportunidade, pela disponibilidade e entusiasta dedicação, bem como pelo seu contributo crítico e científico, sem dúvida, essenciais à elaboração da presente dissertação.

Ao Professor Jorge Carvalho Silva, do GREAT, meu co-orientador, pela disponibilidade e partilha de conhecimentos e conselhos imprescindíveis.

À Professora Maria Gabriela Rodrigues, da FCUL, minha co-orientadora, pela preciosa orientação no que se refere aos procedimentos relativos à cultura celular.

Ao Professor José Luís Ferreira Constantino, do GREAT, pelo incentivo e colaboração.

Ao Professor João Paulo Borges, do CENIMAT, pelo apoio e colaboração.

Ao Doutor Pedro Barquinha, do CENIMAT, pela disponibilidade para a obtenção das imagens de SEM.

À Doutora Ana Baptista, do CENIMAT, pela disponibilidade para a aquisição dos espectros de ATR-FTIR.

Ao Doutor Gabriel Martins, da FCUL, pela imediata disponibilidade para acompanhar e orientar as observações de microscopia referentes às marcações celulares.

À Professora Ana Isabel Moura Santos, da FCM-UNL, por ter disponibilizado alguns materiais utilizados na cultura celular .

À técnica Isabel Ribeiro da Silva, da FCM-UNL, pela disponibilidade para preparar alguns materiais utilizados na cultura celular.

À Andreia Duarte, por ter disponibilizado alguns materiais e pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Cláudia Aragão, Ana Rita Rosa, Luís Martins e Susana Gomes, pela amizade, compreensão e ajuda prestada.

Ao Carlos Santos, pela amizade e pela ajuda dispensada.

Ao Diogo, pelo amor e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicional, e como tributo pela educação dada.

À minha irmã, pelo estímulo e apoio recebidos.

À minha família, especialmente às minhas avós, pelo apoio e orgulho demonstrado.

Com estima e admiração, a todos expresso a minha mais profunda gratidão.





# Resumo

Na sequência de uma lesão da espinal medula, o sistema nervoso desencadeia uma resposta inibitória responsável pela limitada regeneração do tecido neuronal e conseqüentemente a recuperação funcional é reduzida.

Este trabalho teve como objectivo desenvolver estruturas poliméricas constituídas por um suporte poroso e por fibras alinhadas, destinadas à construção de condutas que visam suportar e guiar a regeneração neuronal.

Produziram-se pela técnica de electrofiação matrizes de fibras submicrométricas de gelatina, de gelatina e quitosano e de gelatina e policaprolactona. O alinhamento das fibras foi induzido pela rotação de um colector cilíndrico. As matrizes foram reticuladas por exposição a vapor de glutaraldeído para tornar a gelatina insolúvel em meios aquosos. O processo foi optimizado avaliando a sua eficácia pela perda de massa das matrizes quando imersas em água. As fibras foram caracterizadas morfológicamente, através de imagens de Microscópio Electrónico de Varrimento, e quimicamente por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier.

Foram ensaiadas técnicas para produzir as estruturas porosas de suporte, em policaprolactona, baseadas na separação em fases de soluções de dois polímeros e na prensagem a quente de filmes poliméricos. Ambos os métodos demonstraram ser promissores.

Realizaram-se culturas de células da linha N1E-115 semeadas nas estruturas fibrosas produzidas. As culturas celulares permitiram estabelecer um protocolo de sementeira que permitirá estudar a resposta celular aos diferentes materiais *in vitro*.

Palavras-chave: Lesão da espinal medula; Regeneração guiada; Electrofiação; Gelatina de peixe; Reticulação; Linha celular N1E-115.



# Abstract

Following a spinal cord injury, the nervous system triggers an inhibitory response responsible for limited neuronal tissue regeneration and consequently functional recovery is reduced.

This study is aimed at developing polymeric structures consisting of aligned fibres supported by a porous film, intended for the construction of nerve guidance conduits.

Matrices of submicrometric gelatin fibres, gelatin and chitosan, and gelatin and polycaprolactone were produced by electrospinning. The fibre alignment was induced by the rotation of a cylindrical collector. The matrices were crosslinked by exposure to glutaraldehyde vapour in order to render gelatin insoluble in aqueous media. The process was optimized by assessing its effectiveness through weight loss measurements after immersing the matrices in water. The fibres were morphologically characterized using Scanning Electron Microscope images and chemically characterized using Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

Techniques to produce the supporting porous structures in polycaprolactone were tested, based on two polymers solutions phases separation and on polymeric films hot pressing. Both methods proved to be promising.

N1E-115 neuronal cells were cultured on the produced fibrous structures. The cell cultures allowed to set a cell seeding protocol in order to study *in vitro* cell response to different materials.

Keywords: Spinal cord injury; Guided regeneration; Electrospinning; Fish gelatin; Cross-linking; N1E-115 cell line.



# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>vii</b>
<b>Resumo</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract</b>	<b>xi</b>
<b>Índice</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de siglas</b>	<b>xxi</b>
<b>1 Enquadramento, Objectivos e Estrutura da Dissertação</b>	<b>1</b>
<b>2 Introdução</b>	<b>5</b>
2.1 Neuroanatomia Funcional da Espinal Medula . . . . .	5
2.2 Neurobiologia Celular . . . . .	7
2.3 Lesão da Espinal Medula - resposta e limitações à regeneração . . . . .	10
2.4 Estratégias Terapêuticas . . . . .	11
2.4.1 Regeneração Guiada . . . . .	13
2.5 Produção de nanofibras por electrofiação . . . . .	13
2.6 Biomateriais . . . . .	16
2.6.1 Gelatina . . . . .	17
2.6.2 Quitosano . . . . .	18
2.6.3 Poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	19
<b>3 Materiais e Métodos</b>	<b>21</b>
3.1 Produção de matrizes de nanofibras poliméricas . . . . .	21
3.1.1 Preparação das soluções para electrofiação . . . . .	21
3.1.2 Caracterização das soluções . . . . .	22
3.1.3 Montagem experimental dos Sistemas de Electrofiação . . . . .	23

3.1.4	Electrofiação das soluções . . . . .	26
3.1.5	Reticulação das matrizes . . . . .	27
3.1.6	Avaliação da Perda de Massa . . . . .	29
3.2	Caracterização das matrizes . . . . .	30
3.2.1	Análise da morfologia das fibras . . . . .	30
3.2.2	Análise química das matrizes . . . . .	32
3.3	Cultura Celular . . . . .	33
3.3.1	Avaliação da viabilidade celular . . . . .	35
3.3.2	Observação dos núcleos e do citoesqueleto . . . . .	36
3.4	Produção de filmes porosos . . . . .	36
<b>4</b>	<b>Apresentação e Discussão de Resultados</b>	<b>39</b>
4.1	Caracterização das soluções . . . . .	39
4.2	Produção das matrizes . . . . .	41
4.2.1	Electrofiação . . . . .	41
4.2.2	Reticulação e perda de massa . . . . .	48
4.3	Caracterização das matrizes . . . . .	52
4.3.1	Análise morfológica das fibras após electrofiação . . . . .	52
4.3.2	Análise morfológica das matrizes reticuladas após lavagem . . . . .	57
4.3.3	Análise química por FTIR . . . . .	58
4.4	Cultura celular . . . . .	62
4.5	Produção e caracterização de filmes porosos . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Conclusões e Perspectivas Futuras</b>	<b>73</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>77</b>
	<b>Apêndice-A</b>	<b>85</b>

# Lista de Figuras

2.1	Representação ilustrativa do sistema nervoso . . . . .	6
2.2	Representação ilustrativa de uma secção transversal da espinal medula e vértebra . . . . .	6
2.3	Representação esquemática dos componentes principais do arco reflexo . . . . .	7
2.4	Neurónio e células gliais . . . . .	7
2.5	Representação ilustrativa da neuroglia . . . . .	9
2.6	Representação esquemática da lesão da espinal medula e da cicatriz glial . . . . .	10
2.7	Representação esquemática das fontes potenciais de células estaminais/progenitoras para transplantação para a espinal medula lesionada . . . . .	12
2.8	Representação esquemática do sistema de electrofiação típico . . . . .	14
2.9	Representação esquemática de um sistema de electrofiação com colector rotatório . . . . .	16
2.10	Estrutura da quitina e do quitosano, com x unidades de N-acetilglucoseamina e y unidades de N-glucoseamina . . . . .	18
2.11	Estrutura da Poli( $\epsilon$ -caprolactona) . . . . .	19
3.1	Sistema de electrofiação com colector plano . . . . .	24
3.2	Pormenor do sistema de electrofiação com colector plano . . . . .	24
3.3	Sistema de electrofiação com colector cilíndrico rotatório . . . . .	24
3.4	Colector plano construído para colocação de lamelas quadradas . . . . .	25
3.5	Disco metálico na agulha do sistema de electrofiação com colector cilíndrico . . . . .	26
3.6	Microscópio óptico Nikon Eclipse LV100 . . . . .	26
3.7	Aparelho CL-1000 UV Crosslinker . . . . .	28
3.8	Mecanismo da reacção da reticulação da gelatina por acção do GTA . . . . .	28
3.9	Forno com exsicador contendo as amostras e o cristalizador com solução de GTA . . . . .	30
3.10	<i>Zeiss Auriga Scanning Electron Microscope</i> . . . . .	30
3.11	FTIR Thermo Nicolet 6700 . . . . .	32
3.12	Células N1E-115 . . . . .	33
3.13	Microscópio óptico invertido Olympus CK2 . . . . .	35
3.14	Espectro de absorvância da resazurina e resorufina . . . . .	35
3.15	Microscópio de fluorescência Olympus BX60 . . . . .	36
3.16	Sonicador UP50H . . . . .	37
3.17	Aplicador automático de filmes (BRAIVE Instruments) . . . . .	38

3.18 Prensa - prensagem do molde com filme e sal . . . . .	38
4.1 Curvas de viscosidade das soluções . . . . .	40
4.2 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução de S-GtA - Parâmetros iniciais e finais. Ampliação: 1000x . . . . .	42
4.3 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-GtA (0.3ml/h, 20cm, 18kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 500x	42
4.4 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-GtAA (0.3ml/h, 25cm, 15kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 500x	43
4.5 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação da tensão. Ampliação: 500x . . . . .	44
4.6 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação da distância agulha-colector. Ampliação: 500x . . . . .	44
4.7 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação do caudal. Ampliação: 500x . . . . .	45
4.8 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS (0.2ml/h, 25cm, 18kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 100x	45
4.9 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/PCL para vários conjuntos de parâmetros do processo. Ampliação: 500x . . . . .	46
4.10 Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/PCL (0.3ml/h, 20cm, 10kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Am- pliação: 500x . . . . .	47
4.11 Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com irradiação UV e/ou vapor de GTA (n=8) . . . . .	49
4.12 Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com vapor de GTA (n=5) . . . . .	49
4.13 Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com vapor de GTA (n=7) . . . . .	50
4.14 Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt-a. Ampliação: 2000x . . . .	50
4.15 Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/CS-a. Ampliação: 2000x .	51
4.16 Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-a. Ampliação: 2000x	51
4.17 Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-s. Ampliação: 2000x .	51
4.18 Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-d. Ampliação: 2000x	52
4.19 Distribuições dos diâmetros das fibras (n=30) e respectivas imagens de SEM das matrizes. Ampliação: 5000x . . . . .	53
4.20 Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt-a . . . . .	54
4.21 Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/CS-a . . . . .	55
4.22 Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-a . . . . .	55
4.23 Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-s . . . . .	56
4.24 Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-d . . . . .	56



4.25	Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt-a pós-lavagem . . . . .	57
4.26	Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt/CS-a pós-lavagem . . . . .	57
4.27	Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-a pós-lavagem . . . . .	57
4.28	Imagens de SEM de matrizes de Gt/PCL-s e Gt/PCL-d pós-lavagem. Ampliação: 2000x . . . . .	58
4.29	Espectros de FTIR de amostras de Gt pós-produção e pós-reticulação . . . . .	60
4.30	Espectros de FTIR de amostras de CS pós-produção e pós-reticulação . . . . .	60
4.31	Espectros de FTIR de amostras de Gt/CS pós-produção e pós-reticulação . . . . .	61
4.32	Espectro de FTIR de uma amostra de PCL pós-produção . . . . .	61
4.33	Espectros de FTIR de amostras de Gt/PCL pós-produção . . . . .	61
4.34	Imagens de MF de marcação com DAPI de células N1E-115 ao 4º dia em meio de diferenciação . . . . .	63
4.35	Absorvância - Teste de viabilidade celular com o reagente PrestoBlue® . . . . .	64
4.36	Imagens de MF de marcação com DAPI de células N1E-115 ao 5º dia em meio de diferenciação . . . . .	64
4.37	Placa de 24 poços da cultura celular com anilhas de teflon . . . . .	65
4.38	Células N1E-115 ao 4º dia em meio de diferenciação (controlo do poço C6) . . . . .	66
4.39	Imagens de MF de marcação com DAPI e faloidina de células N1E-115 ao 5º dia em meio de diferenciação . . . . .	67
4.40	Imagens de MO de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PVP com agitação magnética. Ampliação: 100x . . . . .	68
4.41	Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEO com agitação magnética . . . . .	69
4.42	Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEO com agitação ultrassónica . . . . .	69
4.43	Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PVP com agitação ultrassónica . . . . .	70
4.44	Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEG com agitação ultrassónica . . . . .	70
4.45	Imagem de MO de uma filme obtido por prensagem a quente e lixiviação de sais. Ampliação: 100x . . . . .	71
4.46	Imagem de MO de uma filme obtido por dupla prensagem a quente e lixiviação de sais. Ampliação: 100x . . . . .	71
4.47	Imagens de MO da lixa 100 e de um filme resultante da prensagem a quente. Ampliação: 100x . . . . .	72



# Lista de Tabelas

2.1	Principais efeitos dos parâmetros de electrofiação na morfologia das nanofibras	15
3.1	Materiais utilizados na preparação das soluções poliméricas . . . . .	22
3.2	Materiais utilizados na preparação de filmes com separação de fases . . . . .	37
4.1	Viscosidade ( $\gamma=1s^{-1}$ ) e condutividade das soluções ( $T=25^{\circ}C$ ) . . . . .	40
4.2	Parâmetros de electrofiação utilizados na produção das matrizes estudadas . .	41
4.3	Diâmetros médios das fibras dos 5 tipos de matrizes ( $n=30$ ) . . . . .	52
4.4	Modos de vibração FTIR identificados para a gelatina . . . . .	58
4.5	Modos de vibração FTIR identificados para o quitosano . . . . .	59
4.6	Modos de vibração FTIR identificados para o PCL . . . . .	59
4.7	Condições da preparação das soluções de PCL/PEO, PCL/PEG e PCL/PVP	68



# Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>AA</b>	<i>Acetic Acid</i> - Ácido Acético Glacial
<b>ATR-FTIR</b>	<i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada
<b>CAMs</b>	<i>Cells Adhesion Molecules</i> - Moléculas de Adesão Celular
<b>CENIMAT/I3N</b>	Centro de Investigação de Materiais/Instituto de Nanoestruturas, Nanomodelação e Nanofabricação
<b>CS</b>	<i>Chitosan</i> - Quitosano
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DHT</b>	<i>Dehydrothermal Treatment</i> - Tratamento Desidrotérmico
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico
<b>FCM-UNL</b>	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
<b>FCUL</b>	Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
<b>FFT</b>	<i>Fast Fourier Transform</i> - Transformada Rápida de Fourier

<b>FGF</b>	<i>Fibroblast Growth Factor</i> - Factor de Crescimento de Fibroblastos
<b>GR</b>	Grau de Reticulação
<b>GREAT</b>	Grupo de Engenharia de Tecidos
<b>Gt</b>	Gelatina
<b>GTA</b>	Glutaraldeído
<b>Gt-a</b>	Matriz de fibras de gelatina alinhadas
<b>Gt/CS-a</b>	Matriz de fibras de gelatina e quitosano alinhadas
<b>Gt/PCL-a</b>	Matriz de fibras de gelatina e PCL alinhadas
<b>Gt/PCL-d</b>	Matriz de fibras de gelatina e PCL desalinhadas
<b>Gt/PCL-s</b>	Matriz de fibras de gelatina e PCL semialinhadas
<b>MAG</b>	<i>Myelin Associated Glycoprotein</i> - Glicoproteína Associada à Mielina
<b>MAPs</b>	<i>Microtubule Associated Proteins</i> - Proteínas Associadas aos Microtúbulos
<b>MF</b>	Microscópio de Fluorescência
<b>MO</b>	Microscópio Óptico
<b>NF-H</b>	<i>Heavy Neurofilaments</i> - Neurofilamentos Pesados
<b>NF-L</b>	<i>Light Neurofilaments</i> - Neurofilamentos Leves
<b>NF-M</b>	<i>Medium Neurofilaments</i> - Neurofilamentos Médios
<b>NGCs</b>	<i>Nerve Guidance Conduits</i> - Conduitas de orientação nervosa
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i> - Factores de Crescimento Nervoso

<b>Nogo-A</b>	<i>Neurite OutGrowth InhibitOr</i> - Inibidor do Crescimento de Neurites
<b>NSPCs</b>	<i>Stem And Progenitor Cells</i> - Células Neuronais Estaminais e Progenitoras
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão fosfato salino
<b>PCL</b>	<i>Polycaprolactone</i> - Policaprolactona
<b>PEG</b>	<i>Polyethylene glycol</i> - Polietilenoglicol
<b>PEO</b>	<i>Polyethylene oxide</i> - Poli(óxido de etileno)
<b>PGCS</b>	<i>Chondroitin Sulphate Proteoglycans</i> - Proteoglicanos Condroitinosulfatos
<b>PM</b>	Perda de Massa
<b>PVP</b>	<i>Polyvinylpyrrolidone</i> - Poli(Vinilpirrolidona)
<b>SEM</b>	<i>Scanning Electron Microscope</i> - Microscopia Electrónica de Varrimento
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNP</b>	Sistema Nervoso Periférico
<b>UV</b>	Ultravioleta





# 1

## Enquadramento, Objectivos e Estrutura da Dissertação

O sistema nervoso central (SNC) é uma rede de mais de 100 biliões de células nervosas que controlam as nossas acções, a percepção do que nos rodeia e define quem nós somos [1]. A perda do tacto, visão, audição ou movimentos normalmente resultam de doenças ou lesões do SNC. A qualidade de vida do paciente fica comprometida principalmente nos aspectos físicos e sociais, tendo graves implicações psicológicas.

A limitada regeneração da espinal medula resulta de uma complexa cascata de eventos que se seguem a uma lesão, envolvendo inflamação, formação da cicatriz glial e libertação de moléculas inibitórias.

Actualmente os tratamentos clínicos que envolvem a cirurgia e a reabilitação resultam numa recuperação funcional reduzida [2, 3]. Visando a recuperação funcional do paciente, as várias abordagens terapêuticas têm de ser direccionadas para bloquear a resposta inibitória e estimular a regeneração e a plasticidade dos axónios. Têm sido investigadas terapias farmacológicas, no sentido da neuroprotecção e neuroregeneração, e a transplantação de células [3, 4].

Apesar da complexidade da anatomia e fisiologia humana do SNC, nos últimos anos têm-se progredido na engenharia de tecidos, acreditando que a combinação de abordagens com biomateriais, células e moléculas bioactivas venham a possibilitar a recuperação funcional de vítimas de lesão da espinal medula .

## CAPÍTULO 1. ENQUADRAMENTO, OBJECTIVOS E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O correcto funcionamento do sistema nervoso depende do estabelecimento de ligações adequadas dos neurónios a determinados alvos e portanto, durante a reparação do tecido neuronal lesado é imperativo que os axónios se orientem na direcção do restabelecimento das ligações interrompidas.

Conduitas artificiais para orientação da regeneração nervosa (NGCs, do inglês *Nerve Guidance Conduits*) têm vindo a ser desenvolvidas com vista à reparação de lesões tanto do sistema nervoso periférico (SNP) como da espinal medula [5, 6]. As NGCs são estruturas tubulares que, ao serem enxertadas, devem suportar o crescimento dos neurónios, estimulando e orientando o prolongamento dos axónios no sentido do restabelecimento de ligações entre terminações nervosas afectadas pela lesão.

Uma forma de produzir NGCs consiste em utilizar nanofibras poliméricas alinhadas suportadas numa estrutura porosa, que possa ser enrolada para produzir um cilindro de secção recta em espiral, com as nanofibras na direcção do seu eixo. As estratégias e os materiais mais adequados à produção de tubos porosos e resistentes ao colapso continua em investigação.

O primeiro passo neste sentido é a escolha conveniente da composição da estrutura por forma a propiciar a adesão e crescimento celular. Além da biocompatibilidade, porosidade e superfície química apropriadas, a degradação da NGC deve ocorrer a um ritmo adequado, acabando por ser substituída pelo tecido nativo.

Este trabalho teve como objectivo fundamental o desenvolvimento de estruturas poliméricas constituídas por um suporte poroso e por fibras alinhadas, destinadas à construção de NGCs, que possuam características favoráveis à adesão e desenvolvimento das células nervosas, com vista à regeneração guiada do tecido neuronal.

Os biomateriais utilizados foram gelatina, quitosano e policaprolactona (PCL). Estudaram-se matrizes de gelatina e matrizes compósitas de gelatina/quitosano e gelatina/PCL. Para a estrutura porosa foi utilizado PCL.

A gelatina e o quitosano são ambos materiais naturais cujas propriedades favorecem a resposta celular. Utilizou-se gelatina de peixe que é solúvel em água à temperatura ambiente. O PCL é um polímero sintético, biocompatível, biodegradável, hidrofóbico e com excelentes propriedades mecânicas.

O trabalho teve como principais objectivos:

1. Produzir por electrofiação fibras dos materiais seleccionados;
2. Avaliar o grau de alinhamento induzido nas fibras por deposição das mesmas num colector cilíndrico rotatório;
3. Estudar um processo de reticulação das fibras para melhorar a estabilidade da gelatina incorporada;
4. Investigar processos de produção de estruturas porosas adequadas ao suporte das fibras;
5. Estabelecer um protocolo de sementeira de células nas matrizes para o estudo *in vitro* da resposta celular aos diferentes materiais;

6. Cultivar células da linha celular neuronal N1E-115 para avaliar a sua adequação ao teste de materiais destinados à regeneração neuronal.

O trabalho iniciou-se com a produção e caracterização de matrizes de nanofibras poliméricas por electrofiação, nomeadamente, controlo dos parâmetros de produção e de alinhamento, e análise morfológica das fibras. Na análise morfológica recorreu-se a imagens de microscopia electrónica de varrimento e ao programa *ImageJ*. Procedeu-se depois ao estudo do processo de reticulação da gelatina por exposição a vapor de glutaraldeído. A estabilidade das matrizes foi avaliada através de testes de perda de massa. As várias composições foram estudadas por ATR-FTIR.

Foram considerados dois métodos de produção da estrutura de suporte de nanofibras nomeadamente a separação de fases de soluções de polímeros e a prensagem de filmes. Os filmes foram avaliados morfológicamente.

Foi estabelecido um protocolo de cultura celular nas matrizes depositadas em lamelas. Semearam-se células N1E-115 nas matrizes e em controlos por forma a avaliar a sua adesão, crescimento e diferenciação. Foram ensaiados os procedimentos visando quantificar a viabilidade celular usando um teste colorimétrico e caracterizar a morfologia das células por fixação e marcação fluorescente das mesmas.

Este relatório está organizado, para além deste enquadramento geral e definição dos principais objectivos do trabalho, em quatro outros capítulos.

No capítulo 2 faz-se uma introdução ao tema da dissertação. Identificam-se as respostas e limitações à regeneração da espinal medula após lesão e apresentam-se várias estratégias terapêuticas, enfatizando a abordagem da regeneração guiada, onde se insere o presente trabalho.

No capítulo 3 apresentam-se os materiais e as metodologias utilizados na produção e caracterização das estruturas poliméricas desenvolvidas, e na cultura celular.

No capítulo 4 completa-se o objecto do presente trabalho mediante a apresentação, análise e discussão dos resultados.

Finalmente, no capítulo 5 procura-se reter os aspectos mais relevantes deste trabalho e apresentar algumas perspectivas para o seu desenvolvimento futuro.



# 2

## Introdução

### 2.1 Neuroanatomia Funcional da Espinal Medula

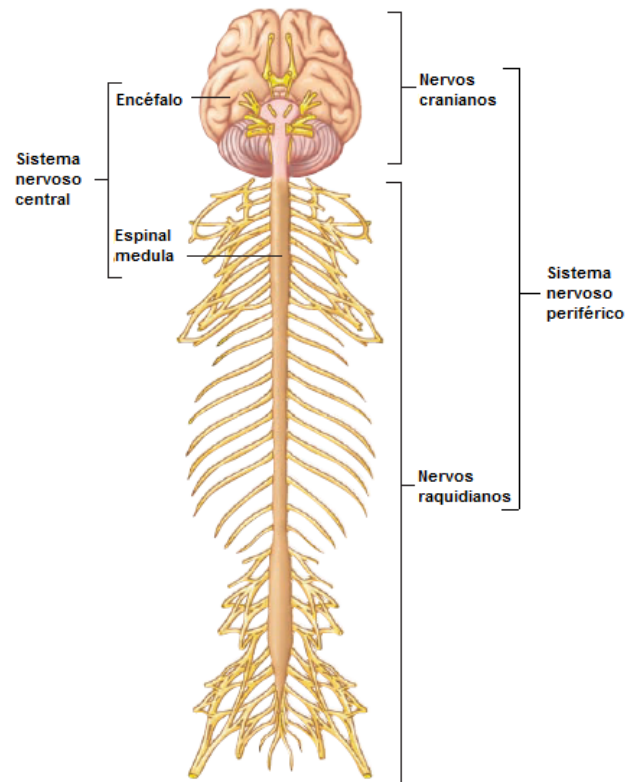
O sistema nervoso humano é dividido em sistema nervoso central, que inclui o encéfalo e a espinal medula, e sistema nervoso periférico, constituído pelos nervos cranianos e pelos nervos raquidianos que têm origem no encéfalo e na espinal medula, respectivamente (ver Fig.2.1).

A função essencial do sistema nervoso passa pela detecção de sinais e estímulos externos e internos ao organismo, a sua conversão em sinais eléctricos e transporte desses impulsos nervosos desde a periferia até ao SNC, onde ocorre a integração dos vários sinais, organização e controlo das funções orgânicas e respostas efectoras (musculares, glandulares, etc).

A espinal medula tem importância vital no funcionamento global do sistema nervoso. Esta estrutura constitui o elo de comunicação entre o encéfalo e o sistema nervoso periférico, integrando a informação que recebe e produzindo respostas através de mecanismos reflexos.

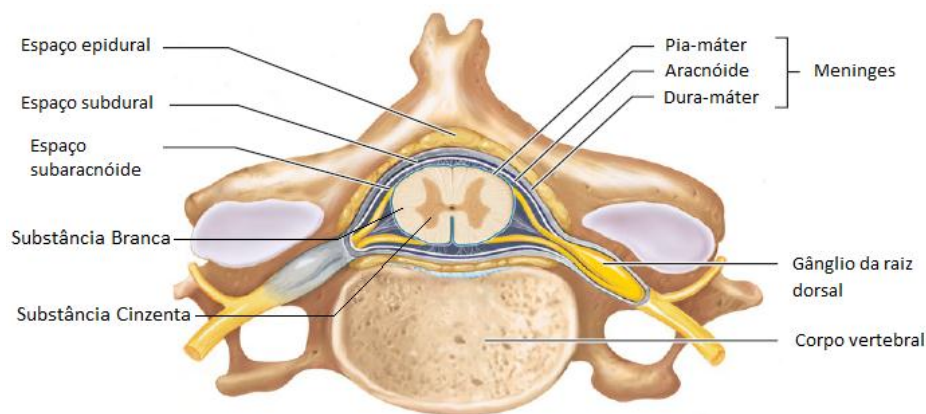
A espinal medula encontra-se ao longo do canal vertebral, envolvida e assim, protegida pelo conjunto de três camadas de tecido conjuntivo, as meninges (dura-máter, aracnóide e pia-máter), e pela coluna vertebral (conjunto de vértebras) [7]. Esta estrutura compõem-se dos segmentos cervical, torácico, lombar e sagrado, denominados de acordo com a área da coluna vertebral por onde passam os 31 pares de nervos raquidianos que nela têm origem (8 cervicais, 12 torácicos, 5 lombares, 5 sagrados e 1 coccígea) [8].

Uma secção transversal da espinal medula revela a existência de substância cinzenta



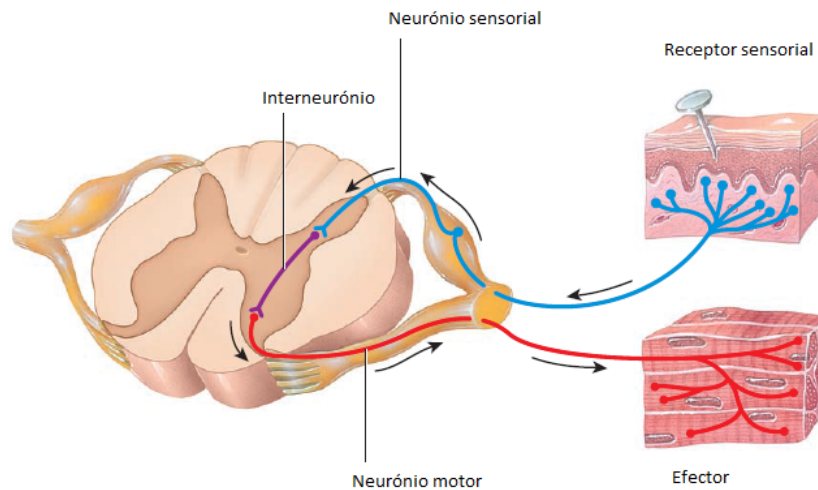
**Figura 2.1:** Representação ilustrativa do sistema nervoso [7] (adaptado)

na zona central e substância branca na periferia, conforme ilustra a Fig.2.2. A matéria branca contém os tractos sensorial e motor, as vias para a condução de impulsos nervosos sensoriais para o cérebro e impulsos dos nervos motores do cérebro para os tecidos efectores. A matéria cinzenta é onde ocorre a integração de potenciais pós-sinápticos excitatórios e potenciais pós-sinápticos inibitórios [9].



**Figura 2.2:** Representação ilustrativa de uma secção transversal da espinal medula e vértebra [10] (adaptado)

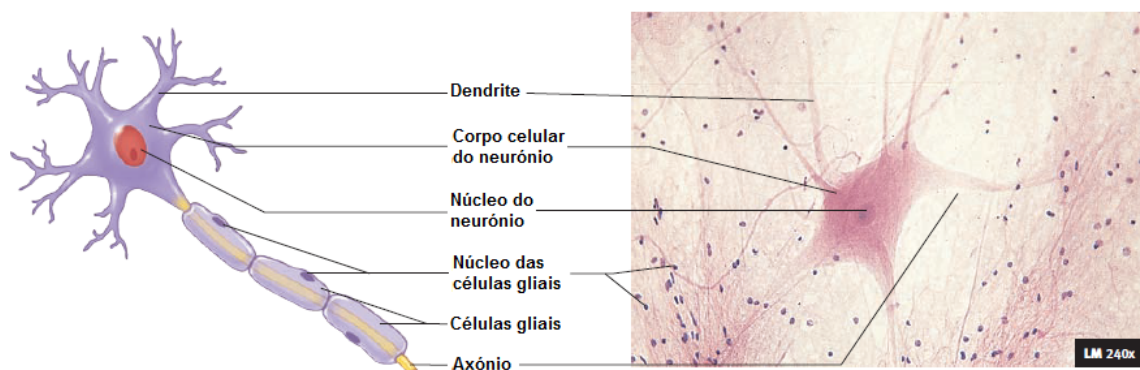
A via seguida pelos impulsos nervosos que produzem um reflexo é designada por arco reflexo (ou circuito reflexo). O arco reflexo prossegue desde o receptor sensorial, que responde a um determinado estímulo, até ao efector. O impulso gerado pelo receptor é conduzido pelo neurónio sensorial até ao centro de integração da informação, que chega ao efector através do neurónio motor, conforme representado na Fig.2.3 [9].



**Figura 2.3:** Representação esquemática dos componentes principais do arco reflexo [9] (adaptado)

## 2.2 Neurobiologia Celular

O sistema nervoso é constituído por dois principais tipos de células: neurónios e células de suporte. No SNC, o conjunto das células de suporte é designado por neuroglia ou células gliais [11]. O neurónio está diferenciado especialmente para a transmissão e processamento de impulsos nervosos. A constituição do neurónio compreende o corpo celular (ou pericário) e dois tipos de prolongamentos, as dendrites, geralmente curtas e como uma disposição ramificada e o axónio, único e mais extenso, que termina numa rede de ramificações, o cone de crescimento [12]. Os neurónios podem apresentar diferentes formas e tamanhos, sendo que o corpo celular tipicamente tem  $10\text{-}50\mu\text{m}$  (ver Fig.2.4) [13].



**Figura 2.4:** Neurónio e células gliais [7] (adaptado)

O citoesqueleto dos neurónios apresenta uma estrutura constituída por neurofibrilhas, resultantes da junção de dois componentes fibrosos fundamentais, os neurotúbulos (ou microtúbulos neuronais) e os neurofilamentos. As neurofibrilhas estendem-se em todas as direcções e continuam para o interior das dendrites e do axónio [12].

Os neurotúbulos são estruturas cilíndricas ocas, com cerca de 25nm de diâmetro, constituídas por tubulina e dispõem-se paralelamente nos axónios. Os neurotúbulos são elementos estruturais que desempenham um papel essencial no transporte intracelular bem como no crescimento e desenvolvimento neuronal. A estabilidade dos neurotúbulos depende de proteínas que se ligam lateralmente aos mesmos, denominadas proteínas de associação a microtúbulos (MAPs, do inglês *Microtubule Associated Proteins*) [12, 14].

Os neurofilamentos (NF) abundam essencialmente nos axónios. Os NF desempenham basicamente um papel estrutural e são determinantes da morfologia celular (neurónios e células da glia). Os neurofilamentos pertencem ao sistema de filamentos intermediários, de 10nm, cujas componentes principais nos neurónios maduros são as proteínas designadas por NF-L, NF-M e NF-H para leve, médio e pesado, respectivamente (do inglês *light, medium e heavy*). Uma outra proteína, a  $\alpha$ -internexina, é expressa somente no início do desenvolvimento do sistema nervoso [14].

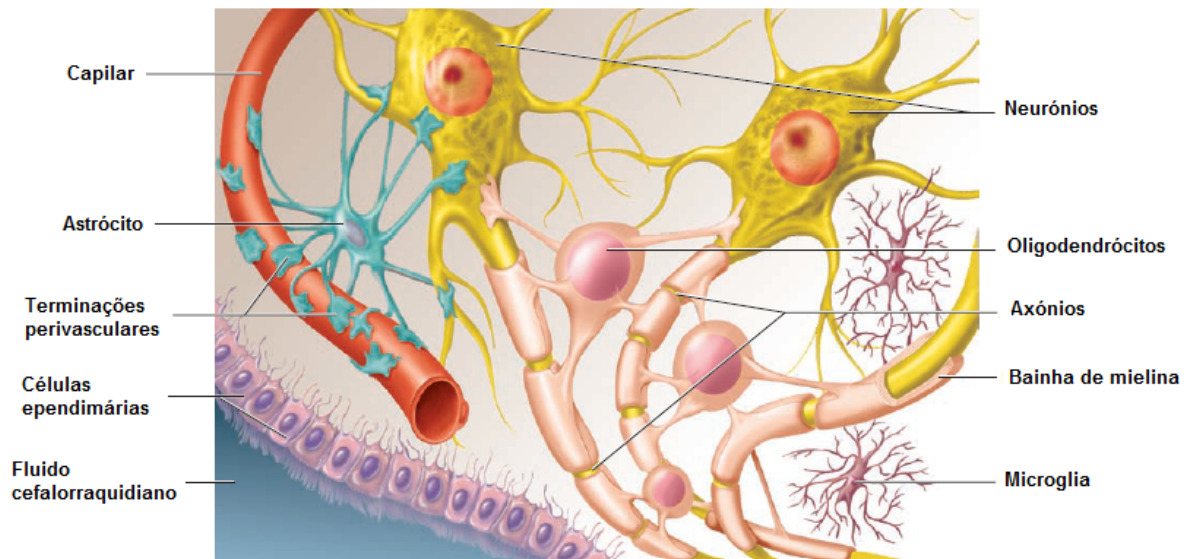
O citoesqueleto neuronal é ainda constituído por microfilamentos (ou filamentos de actina), filamentos de 5-7nm de diâmetro, constituídos pela polimerização da proteína globular actina-G, originando os filamentos de actina-F. Os microfilamentos permitem manter a distribuição das proteínas associadas à membrana, são mediadores da interacção dos neurónios com a matriz extracelular e com células vizinhas, e participam no movimento celular. [14]

Durante o desenvolvimento embrionário, o neurónio sofre um aumento em volume, em número e na complexidade dos seus prologamentos e contactos funcionais. Após este período, os neurónios geralmente não se dividem, mas permanecem num estado de interfase permanente ao longo de toda a vida [12].

As células de suporte proporcionam nutrição e suporte aos neurónios. Ao contrário dos neurónios, estas células têm alguma capacidade de divisão celular [4]. Existem seis tipos de células de suporte, sendo que apenas quatro delas fazem parte da neuroglia: oligodendrócitos, astrócitos, microglia e células ependimárias, conforme ilustra a Fig.2.5. As células de Schwann e células satélite apenas existem no sistema nervoso periférico [11].

Os oligodendrócitos produzem as bainhas de mielina que existem em torno de alguns axónios; os astrócitos sintetizam factores neurotróficos e contribuem para a barreira hematoencefálica; a microglia (pequenos macrófagos) desempenha importantes funções de defesa imunológica do SNC, pois tem capacidades fagocíticas e antigénicas, e as células ependimárias formam o revestimento epitelial das cavidades do cérebro e do canal central da espinal medula e, quando associadas a vasos sanguíneos, formam os plexos coróides, os quais produzem o líquido cefalorraquidiano [4, 11, 15].





**Figura 2.5:** Representação ilustrativa da neuroglia [11] (adaptado)

A mielina é essencial para o correcto funcionamento do SNC. Esta é produzida pelos oligodendrócitos e, ao formar uma camada isolante (bainha de mielina) em torno dos axónios, permite aumentar a velocidade de condução do impulso nervoso. A bainha de mielina consiste num sistema multilamelar lipoproteico. Aos espaços sem mielina, onde a membrana plasmática do axónio fica exposta ao fluido extracelular, chamam-se nódulos de Ranvier [12, 16]. A substância branca está associada às áreas de tecido com grandes concentrações de axónios mielinizados, enquanto que a substância cinzenta é formada essencialmente por corpos celulares e dentrites [11].

O processo de comunicação do sistema nervoso a nível celular realiza-se através da transmissão sináptica, que ocorre em estruturas funcionalmente especializadas para a transmissão dos impulsos nervosos - sinapses.

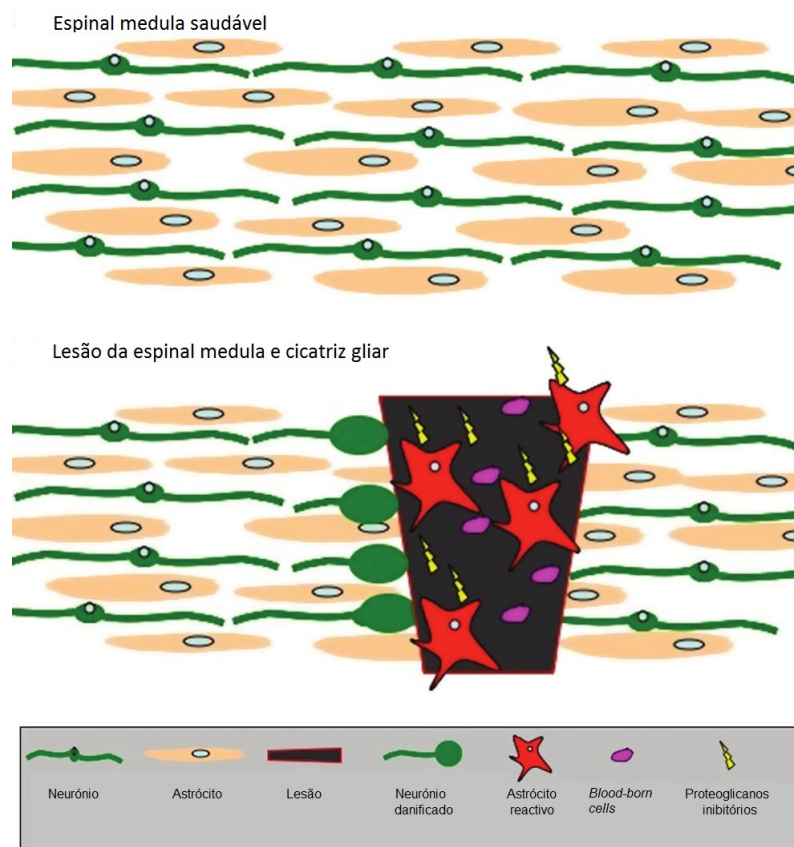
A sinapse é uma região de contacto muito próximo onde ocorre a transferência de informação entre neurónios ou entre um neurónio e uma célula efectora, na qual são transmitidas acções excitatórias ou inibitórias numa única direcção [12]. Esta transmissão do impulso nervoso é mediada principalmente por um mecanismo químico. Porém, a transmissão tanto pode ser química como eléctrica e assim, as sinapses são classificadas como químicas ou eléctricas, respectivamente. Na sinapse eléctrica há contacto directo entre as membranas, o que facilita a passagem da corrente do elemento pré-sináptico para o pós-sináptico sem atraso, mas não no sentido inverso. A transmissão química baseia-se na libertação localizada, pelas vesículas sinápticas, de transmissores químicos específicos, designados neurotransmissores, resultando da interação destes últimos com proteínas receptoras específicas presentes na membrana do neurónio [12].

## 2.3 Lesão da Espinal Medula - resposta e limitações à regeneração

Mundialmente, estima-se existirem 2,5 milhões de pessoas que sofrem uma lesão da espinal medula, devido a acidentes rodoviários, quedas, violência, desportos, entre outras causas [3]. A lesão da espinal medula pode conduzir à perda das funções neurológicas e, conseqüentemente, comprometer o funcionamento sensorial e motor, dependendo do nível da lesão [5].

Em oposição ao que acontece no SNP ou no sistema nervoso embrionário, a espinal medula não recupera espontaneamente após lesão [4, 17, 18]. A limitada recuperação da espinal medula no adulto é não só intrínseca ao próprio SNC como também potenciada pelo ambiente extrínseco inibitório, que se estabelece após a lesão, e que impede a regeneração e plasticidade axonal [17, 19, 20].

Independentemente da origem da lesão, a resposta do SNC é praticamente sempre a mesma, embora alguns pormenores variem para diferentes tipos de patologia [21]. Após lesão da espinal medula coloca-se uma barreira à regeneração que surge como um conjunto de eventos envolvendo inflamação, formação da cicatriz glial e libertação de moléculas inibitórias, resultando na desmielinização dos axónios e em morte celular massiva [5, 21].



**Figura 2.6:** Representação esquemática da lesão da espinal medula e da cicatriz glial [22] (adaptado)

A cicatriz glial resulta do recrutamento de microglia, células das meninges, oligodendrócitos precursores e da hiperplasia/hipertrofia de astrócitos, denominados astrócitos reactivos [18, 19, 21]. Para o ambiente inibidor contribuem de forma preponderante moléculas inibidoras, destacando-se a proteína de inibição ao crescimento de neurites (Nogo-A, do inglês *Neurite OutGrowth inhibitOr*), a glicoproteína associada à mielina (MAG, do inglês *myelin-associated glycoprotein*), a glicoproteína da mielina do oligodendrócito (OMgp, do inglês *oligodendrocyte-myelin glycoprotein*) e a tenascin-R e, ainda, proteoglicanos condroitino-sulfatos (PGCS, do inglês *chondroitin sulphate proteoglycans*). Consideram-se as moléculas inibidoras da mielina aquelas que mais contribuem para a resposta do SNC, seguidas das PGCS [18, 21]. Têm sido identificadas ainda outras moléculas inibitórias tais como a semaforina 4D e a efrina B3 [21].

## 2.4 Estratégias Terapêuticas

A reparação da espinal medula lesada tem sido um dos grandes desafios na neurociência experimental desde que Tello e Cajal descobriram pela primeira vez, em 1903, que os axónios do SNC podem ser estimulados a regenerar [23]. A reparação do tecido neuronal e estratégias de regeneração têm recebido especial atenção, pois afectam directamente a qualidade de vida do paciente [24].

Os objectivos gerais das estratégias terapêuticas a seguir aquando da lesão da espinal medula passam por regular os factores de inibição, repor as células perdidas, promover a regeneração direccionada para os alvos adequados e encorajar a remielinização dos axónios regenerados [25].

Desde a descoberta de que a formação da cicatriz glial está associada à criação de um ambiente bioquímico desfavorável à regeneração neuronal, têm sido exploradas abordagens com vista a bloquear os factores inibitórios, promovendo assim maior recuperação funcional após lesão da espinal medula [19].

Por outro lado, têm sido desenvolvidas várias estratégias de transplante de células com o objectivo de ultrapassar as limitações intrínsecas à regeneração do SNC e, assim, substituir neurónios lesados e promover um ambiente favorável à sua regeneração. Por exemplo, substituir células de suporte como os oligodendrócitos, pode conduzir à remielinização dos axónios [3].

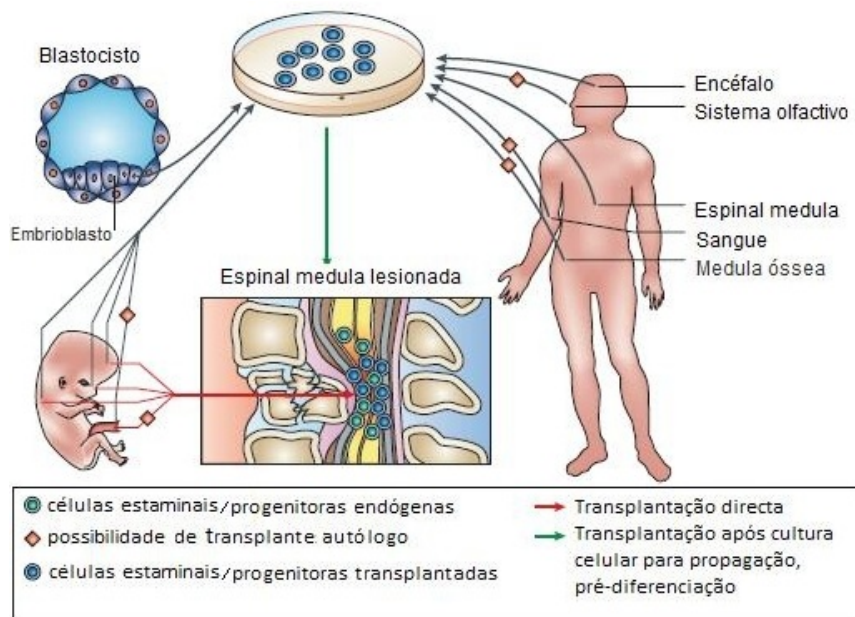
Transplantes de nervos periféricos autólogos combinados com anti-inflamatórios ou adesivo de fibrina e factor de crescimento de fibroblastos (FGF, do inglês *Fibroblast growth factor*) têm sido utilizados. No entanto, Thuret *et al.* sugerem que haja uma revisão e uma maior investigação neste âmbito relativamente à segurança e eficiência do transplante [3].

O transplante de células de Schwann tem sido extensamente estudado e tem demonstrado potencial como terapia celular do SNC [4, 26]. As células de Schwann expressam vários factores e moléculas de superfície, e produzem laminina, fibronectina e colagénio que promovem o crescimento dos axónios. [26] Alguns estudos têm comprovado a vantagem e eficácia

destas células na promoção da regeneração e remielinização dos axónios. No entanto estes benefícios não têm sido observados para além do local do transplante [26].

Vários estudos sustentam que as células da mucosa olfactiva ou células gliais olfactivas são outras células promissoras [2, 3, 4, 26]. Em particular, estudos em Portugal, de Lima *et al.* evidenciam a segurança e potencialidade do transplante de células da mucosa olfactiva na recuperação dos pacientes, principalmente quando combinada com reabilitação pós-cirúrgica [27, 28].

A utilização de células estaminais também tem recebido particular atenção nos últimos anos. A plasticidade (pluripotencialidade) exibida por estas células é uma das razões principais da sua escolha no contexto da terapia celular. Particularmente, as células neuronais estaminais e progenitoras (NSPCs, do inglês *Neural Stem And Progenitor Cells*), que podem ser isoladas do CNS embrionário ou adulto (ver Fig.2.7), diferenciam-se em vários tipos de células, permitindo reparar o tecido lesado [1].



**Figura 2.7:** Representação esquemática das fontes potenciais de células estaminais/progenitoras para transplantação na espinhal medula lesionada [3] (adaptado)

Na área da engenharia de tecidos, têm sido exploradas diversas estratégias para promover a extensão dos axónios no local da lesão, usando factores de crescimento nervoso (NGF, do inglês *Nerve Growth Factor*) e estruturas de suporte, utilizando biomateriais. Normalmente, estas aplicações resultam num crescimento dos axónios de forma aleatória e que não se estende para além do local da lesão [29]. O desenvolvimento de estruturas físicas de suporte para orientação da regeneração neuronal juntamente com factores neurotróficos e/ou transplante celular, poderão ajudar a manter a organização dos axónios regenerados e potenciar a recuperação funcional sensorial e motora, constituindo assim uma abordagem promissora. A combinação de células estaminais com materiais de suporte é uma das estratégias mais promissoras na perspectiva clínica da regeneração do tecido neuronal [30].

### 2.4.1 Regeneração Guiada

O sucesso da regeneração do tecido neuronal encontra-se para além da substituição do tecido danificado [31]. A orientação física dos axónios constitui um elemento crucial para guiar a regeneração no sentido de restabelecer as ligações neuronais [4].

Uma estratégia da engenharia de tecidos que tem sido adoptada, para encorajar os axónios afectados após lesão a restabelecer as conexões sinápticas correctas, é o desenvolvimento de condutas artificiais para orientação da regeneração nervosa [6]. Hipoteticamente, um suporte biodegradável com uma topografia que induza o crescimento dendrítico orientado permitirá que o restabelecimento das conexões se torne efectivo.

Os materiais e estrutura das NGCs devem obedecer a uma série de requisitos que determinarão o sucesso do seu desempenho. As propriedades físicas que as NGCs devem ter são essencialmente uma parede biodegradável e porosa e uma matriz interna orientada para suportar a migração de células e actividade eléctrica. Adicionalmente poderão ainda possibilitar a entrega de moléculas bioactivas e a incorporação de células de suporte [4].

Diversos estudos indicam que uma topografia com pistas celulares combinada com a utilização de biomoléculas tem potencial para promover o crescimento dos axónios nas zonas lesadas da espinal medula [6, 32]. A resposta das células neuronais à topografia dos suportes biodegradáveis, é complexa e depende das suas características físicas, nomeadamente, dimensão e forma. Vários estudos *in vitro* foram realizados nos últimos anos com o objectivo de analisar a reacção de células estaminais, células primárias e células gliais a fibras alinhadas [6].

Além dos factores neurotróficos, a adição de moléculas da matriz extracelular e moléculas de adesão celular (CAMs, do inglês *Cells Adhesion Molecules*) são importantes para recriar um ambiente propício à regeneração neuronal [22].

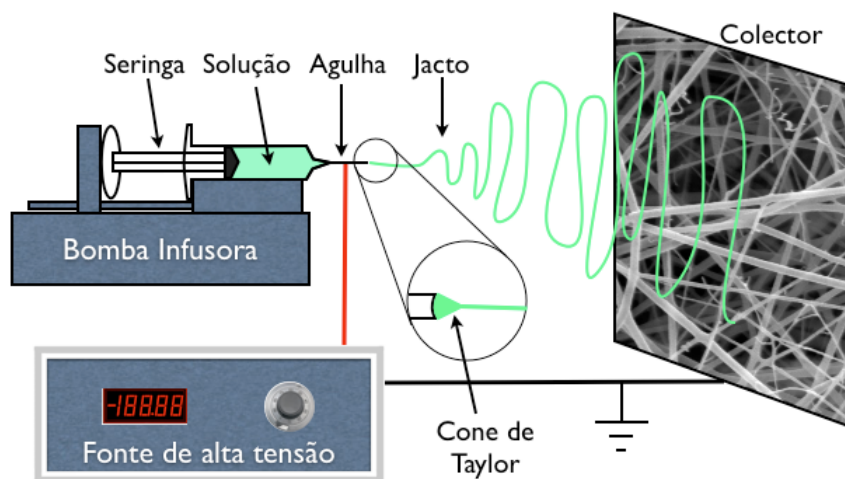
## 2.5 Produção de nanofibras por electrofiação

Nanofibras poliméricas podem ser produzidas usando várias técnicas, tais como a separação de fases, a auto-montagem ou a electrofiação [33]. A versatilidade do processo é a principal vantagem da electrofiação, constituindo-se na técnica mais requerida para produção de nanofibras poliméricas [34, 35, 36, 37].

Embora o início da história da técnica de electrofiação remonte à primeira metade do século XX, assistiu-se ao seu crescente interesse, especialmente nas últimas duas décadas, provavelmente devido à emergente investigação na área da nanotecnologia, sustentada pelo grande número de publicações científicas e patentes de investigadores de todo o mundo [34, 38].

Actualmente, a técnica é utilizada visando diversas aplicações, destacando-se na área das ciências biomédicas para a produção de substitutos de tecidos biológicos lesados e sistemas de libertação controlada de fármacos, entre outras [35, 37, 39].

A configuração básica de um sistema de electrofiação consiste nos seguintes componentes: um recipiente para a solução, habitualmente uma seringa com uma agulha acoplada, uma bomba infusora, para controlar o caudal da solução, uma fonte de alta tensão e um colector de material condutor, estático ou com possibilidade de movimento de rotação e/ou translação (ver Fig.2.8) [38].



**Figura 2.8:** Representação esquemática do sistema de electrofiação típico [40] (adaptado)

No processo de electrofiação, a solução polimérica que é ejetada pela agulha, inicialmente tenderia a adquirir uma forma esférica devida à tensão superficial. No entanto, quando a tensão positiva aplicada à agulha, tipicamente na ordem das dezenas de kV, carrega a gota e, conseqüentemente, surgem forças de repulsão electrostática entre as cargas na sua superfície e uma força coulombiana exercida pelo campo eléctrico externo, que se estabelece entre a agulha e o colector ligado à terra. Sob a acção destas interacções electrostáticas, a gota da solução adquire numa forma cónica, denominada por cone de Taylor [41]. Quando as forças electrostáticas repulsivas ultrapassam a tensão superficial da solução, emerge um jacto da ponta do cone de Taylor. Da repulsão entre as cargas transportadas pelo jacto resulta o seu estiramento e conseqüentemente diminuição do diâmetro da fibra. Enquanto o jacto viaja, exibindo um comportamento instável e disperso, executando um movimento em forma de espiral em direcção ao colector, o solvente evapora. Assim, a fibra é depositada aleatoriamente no colector, formando uma matriz de fibras poliméricas sólidas e de reduzida dimensão, usualmente designadas por nanofibras [35, 38, 41]. Um tempo de produção adequado, ou seja, a suficiente e contínua deposição da nanofibra em camadas no colector, forma, em termos de macroestrutura, uma matriz tridimensional.

A morfologia das fibras obtidas por electrofiação depende decisivamente dos pãrametros utilizados no processo, sendo que o efeito resultante é conseqüente da conjugação de todos eles. As propriedades da solução que influenciam o processo de electrofiação e, conseqüentemente, as características das fibras obtidas, são a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. A massa molecular do(s) polímero(s) e concentração na solução

bem como o solvente utilizados influenciam essas propriedades. Os parâmetros do processo são o caudal da solução, o diâmetro interno da agulha, a tensão aplicada à agulha, a distância agulha-colector e as características do colector, isto é, geometria e movimento, e tensão aplicada ao mesmo. As condições ambientais, como a temperatura e a humidade relativa, são também determinantes na morfologia das fibras resultantes do processo de electrofição [35]. Na tabela 2.1 estão sumariados os principais efeitos da variação de cada um dos parâmetros na morfologia das fibras.

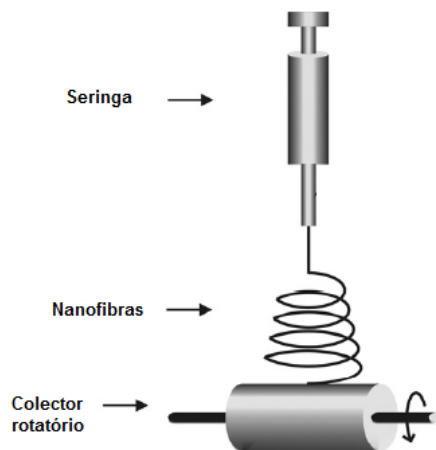
**Tabela 2.1:** Principais efeitos dos parâmetros de electrofição na morfologia das nanofibras [38] (adaptado)

<b>Parâmetros</b>	<b>Efeito na morfologia das fibras</b>
Tensão	Alteração no diâmetro das fibras com o aumento da tensão devida a aumento da carga transportada e diminuição do tempo de voo do jacto
Caudal	Diminuição do diâmetro das fibras com a diminuição do caudal
Distância entre a agulha e o colector	Aumento da probabilidade de surgirem contos nas fibras com o aumento da distância
Viscosidade da solução	Aumento do diâmetro das fibras com o aumento da viscosidade
Condutividade da solução	Diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da condutividade
Tensão superficial da solução	Aumento da probabilidade de surgirem contos nas fibras com o aumento da tensão superficial
Temperatura	Diminuição do diâmetro das fibras com o aumento da temperatura
Humidade relativa	Aumento da probabilidade de aparecimento de poros circulares nas fibras e diminuição da taxa de evaporação de solventes aquosos com o aumento da humidade

Os relatos da literatura relativos à aplicação da técnica de electrofiação para produção de nanofibras poliméricas revelam que uma enorme variedade de polímeros, quer naturais, quer sintéticos, têm sido utilizados e caracterizados para diversas aplicações [37, 38].

A grande vantagem das nanofibras em aplicações no domínio da engenharia de tecidos reside, fundamentalmente, na mimetização da matriz extracelular, além de possuírem elevadas porosidade e razão área superficial/volume. [34, 36, 42, 43]. Estas propriedades influenciam fortemente o comportamento celular, promovendo a adesão, migração e proliferação das células nas matrizes de nanofibras. [36, 43, 44, 45]

Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que as células proliferam preferencialmente segundo a direcção de fibras alinhadas, as quais normalmente são obtidas por electrofiação usando um colector rotatório. [42, 46] Em Teo *et al.* [34] é apresentado um conjunto de diversos colectores que podem ser usados num sistema de electrofiação para obtenção de fibras alinhadas e são destacadas as principais vantagens e desvantagens de cada um deles. Na Fig.2.9 apresenta-se um esquema simplificado de um sistema de electrofiação com o colector mais frequentemente utilizado com este propósito.



**Figura 2.9:** Representação esquemática de um sistema de electrofiação com colector rotatório [47] (adaptado)

## 2.6 Biomateriais

As estratégias da engenharia de tecidos, em particular para a regeneração dos neurónios, está extremamente dependente do tipo de biomateriais usados no desenvolvimento dos suportes celulares, que podem ser naturais ou sintéticos. A utilização clínica dos biomateriais tem apresentado alguns benefícios importantes para a abordagem neurocirúrgica e, consequentemente, para reabilitação [48].

A selecção dos biomateriais para possível utilização na regeneração da espinal medula deve reunir os seguintes requisitos: biocompatibilidade, taxa de degradação ajustada ao tempo em que decorre a regeneração e produtos de degradação não tóxicos, e propriedades



mecânicas que, por um lado, sejam adequadas para o local da lesão e, por outro, que suportem os procedimentos cirúrgicos quando implantados no paciente [5, 44].

Um material que fica permanentemente no organismo tem associado um maior risco de infecção e resposta inflamatória, pelo que uma NGC que degrade enquanto decorre a regeneração do tecido neuronal é preferível [4]. Em geral, os materiais naturais apresentam melhor biocompatibilidade [49]. Contudo, este tipo de material necessita, quase sempre, de extensa purificação e preparação complexa. Por outro lado, geralmente, os materiais sintéticos, apresentam maior facilidade de processamento e controlo das suas propriedades mecânicas, físicas e químicas [4].

Note-se que o sucesso da regeneração de qualquer tecido resulta da combinação dos materiais escolhidos para a produção dos suportes biodegradáveis com topografia adequada, com moléculas bioactivas e células.

### 2.6.1 Gelatina

A gelatina é um polímero natural obtido por hidrólise parcial e controlada do colagénio [44, 49, 50]. No processo de produção de gelatina são quebradas ligações covalentes e pontes de hidrogénio que estabilizam a configuração em tripla-hélice do colagénio - a conformação helicoidal dá origem a uma conformação enrolada aleatoriamente. A gelatina é assim, um biopolímero idêntico ao colagénio no que diz respeito à sua composição e propriedades biológicas. O colagénio é uma das proteínas que formam a matriz extracelular e o principal constituinte da pele, do osso e de outros tecidos conjuntivos.

A gelatina apresenta vantagens relativamente a outros polímeros, nomeadamente, por ter origem biológica, pela sua biocompatibilidade, biodegradação, pelas excelentes propriedades de adesão, disponibilidade comercial e baixo custo [51]. Vários estudos demonstraram que a gelatina promove a adesão e proliferação das células, devido à presença de sequências de aminoácidos do tipo Arg-Gly-Asp (RGD) [44, 52].

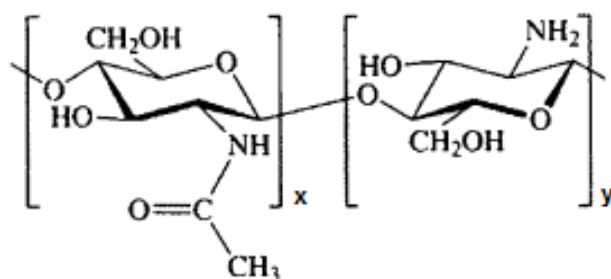
A gelatina, ao contrário da maioria dos polímeros sintéticos, possui grupos ionizáveis (amidas, amins primárias e carboxilos). Os grupos funcionais carboxilo (COOH) e amina (NH<sub>2</sub>) podem ser ionizados por agentes ácidos ou básicos. Numa solução aquosa, esta ionização dá origem a um polímero carregado acompanhado por contraíões [49].

A gelatina de origem de mamífero, tipicamente de bovino, é solúvel em água a 40°, enquanto que a gelatina derivada de peixe é solúvel em água à temperatura ambiente, o que, obviamente, simplifica a electrofiação de soluções deste tipo de gelatina. A gelatina de peixe tem uma estrutura e composição similares à de mamífero, excepto um conteúdo inferior de prolina e hidroxiprolina.

Raramente a gelatina é considerada como um material candidato para aplicações biomédicas sem tratamentos especiais, essencialmente por ser um polímero solúvel em água e apresentar fracas propriedades mecânicas [50, 53]. Assim, a gelatina é reticulada e/ou combinada com polímeros sintéticos por forma a manter a sua estrutura [50, 53].

### 2.6.2 Quitosano

O quitosano (CS) é um biopolímero linear, obtido através da desacetilação parcial da quitina [1]. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza após a celulose, encontrada, por exemplo, no exosqueleto dos crustáceos, insectos e nas paredes celulares dos fungos [1]. Na Fig.2.10 está representada a estrutura da quitina e o quitosano. Na prática, as designações quitina e quitosano referem-se a copolímeros com unidades N-glucoseamina e unidades N-acetilglucoseamina. A desacetilação consiste na substituição do grupo acetil ( $C_2H_3O$ ) por um H, com formação de grupos amina. O que distingue o CS da quitina é apenas a quantidade de grupos amina presentes [54].



**Figura 2.10:** Estrutura da quitina e do quitosano, com x unidades de N-acetilglucoseamina e y unidades de N-glucoseamina [54]

Considera-se o quitosano o polissacarídeo com um mínimo de 50% de desacetilação (percentagem de grupos amina presentes), sendo mais comum possuir um grau de desacetilação de 70-90%. As condições em que ocorre a reacção de desacetilação conferem ao CS as suas características principais, nomeadamente a sua massa molecular média e o grau de desacetilação. O grau de desacetilação influencia a solubilidade do CS, bem como a viscosidade das soluções à base de CS [54].

O quitosano é um polímero semicristalino, sendo que o seu grau de cristalinidade depende do grau de desacetilação. A solubilidade do quitosano, por sua vez, depende dos grupos amina livres e da natureza do solvente usado. Em soluções ácidas diluídas, os grupos amina livres protonizam e o quitosano torna-se totalmente solúvel a pH inferior a 5. O CS é, geralmente, insolúvel em soluções aquosas cujo pH seja superior a 7 [1].

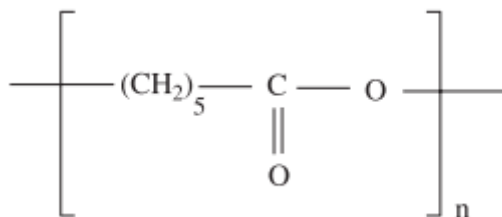
O quitosano tem sido largamente aplicado nas áreas farmacêuticas e biomédicas, entre outras (agricultura, tratamento industrial de poluentes, etc). As suas características apelativas tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesividade, capacidade de adsorção de água, actividade contra fungos, bactérias e vírus e o seu poder hemostático, sustentam esse facto [54]. A quitina e, conseqüentemente, o quitosano podem ser obtidos a partir da casca do camarão, permitindo, simultaneamente, a valorização de resíduos alimentares.

Xiaoguang *et al.* demonstraram num estudo *in vivo* que os implantes de quitosano no local da lesão da espinal medula promoveram a regeneração axonal, levando à recuperação funcional parcial dos membros posteriores dos ratos [55].

Num outro estudo *in vivo*, também com vista à recuperação após lesão da espinal medula, Bozkurt *et al.* demonstraram que num grupo de cobaias que recebeu NSPCs suportadas por uma estrutura tubular de quitosano, a sobrevivência celular foi mais prolongada relativamente à verificada num grupo em que as NSPCs foram injectadas directamente no local da lesão. Tal facto sugere que a adesão celular ao suporte de quitosano tem um papel crucial na sobrevivência das células transplantadas [56].

### 2.6.3 Poli( $\epsilon$ -caprolactona)

O PCL é um poliéster alifático sintético, semicristalino, hidrofóbico, com grande elasticidade e biocompatível [1]. O PCL pode ser obtido pela abertura de anel e polimerização de monómeros, ' $\epsilon$ -caprolactona'. Tem um ponto de fusão próximo de 60°C e uma temperatura de transição vítrea de -60°C. O PCL é solúvel numa ampla variedade de solventes orgânicos e oferece a vantagem de ser miscível com uma grande variedade de polímeros, e é facilmente processável [57].



**Figura 2.11:** Estrutura da Poli( $\epsilon$ -caprolactona) [57]

Ao contrário da gelatina, o PCL é hidrofóbico e conhecido por não facilitar a adesão celular. Desta forma, será vantajoso proceder a modificações de superfície quando se utiliza PCL para produzir suportes celulares [58]. Para aumentar a hidrofiliidade podem ser aplicados tratamentos com plasma ou com hidróxido de sódio (NaOH). Uma estratégia que tem sido adoptada para promover a adesão celular a suportes de PCL é incorporar biomoléculas ou materiais encontrados na matriz extracelular, entre os quais o colagénio, laminina e fibronectina [59]. Neste sentido, Ghasemi-Mobarakeh *et al.* usaram Matrigel<sup>TM</sup> <sup>1</sup> para modificar nanofibras de PCL produzidas por electrofiação. Esta modificação foi conseguida através de duas metodologias diferentes, sendo uma, a adição de Matrigel<sup>TM</sup> à solução de PCL e a outra, a ligação covalente da Matrigel<sup>TM</sup> às fibras de PCL previamente submetidas a tratamento com NaOH [60]. Zhang *et al.* verificaram que células cultivadas em matrizes compostas por PCL e gelatina se infiltravam mais nestas matrizes do que em matrizes de apenas PCL. Segundo os mesmos autores, a adição da gelatina ao PCL proporciona maior afinidade celular e a migração celular é facilitada pelos espaços que se criam enquanto a gelatina se dissolve gradualmente [53].

<sup>1</sup>Material preparado a partir da membrana basal reconstituída que é extraída do sarcoma de rato *Engelbreth-Holm-Swarm*(EHS), um tumor rico em proteínas da matriz extracelular.



# 3

## Materiais e Métodos

### 3.1 Produção de matrizes de nanofibras poliméricas

#### 3.1.1 Preparação das soluções para electrofiação

Neste trabalho foram preparadas soluções poliméricas tendo em vista a produção de matrizes de nanofibras de gelatina (Gt) e matrizes compósitas de gelatina/quitosano (Gt/CS) e de gelatina/PCL (Gt/PCL), através do processo de electrofiação.

A selecção e combinação destes biomateriais foi baseada nas suas características. A gelatina foi eleito como o biomaterial base deste estudo, devido essencialmente às excelentes propriedades de adesão. A combinação da gelatina com o quitosano prende-se com o facto deste ser também de origem natural e pelo seu sucesso em diversas aplicações [52]. O PCL foi escolhido com base nas suas excelentes propriedades mecânicas. As evidências de que a combinação de PCL e gelatina é adequada para o desenvolvimento celular é outra razão que levou a esta escolha [53].

Foi ainda utilizado Poli(óxido de etileno) (PEO) como adjuvante na electrofiação das soluções com quitosano. Os solventes utilizados foram ácido acético glacial (AA) e água destilada. Na tabela 3.1 apresentam-se algumas especificações destes materiais.

As concentrações dos polímeros nas soluções serão indicadas como a percentagem mássica de polímero.

Inicialmente, foi preparada uma solução de 40% de gelatina em água destilada à

**Tabela 3.1:** Materiais utilizados na preparação das soluções poliméricas

Material	Fornecedor	Fórmula Química/Fonte	Massa Molecular [g/mol]
Gelatina	Sigma-Aldrich	Pele de peixe de água fria	60 000
Quitosano	Cognis S	Casca de camarão	500 000
PCL	Sigma-Aldrich	$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$	70 000 - 90 000
PEO	Sigma-Aldrich	$(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$	2 000 000
Ácido Acético	Panreac	$\text{CH}_3\text{COOH}$	60.05

temperatura ambiente, dado tratar-se de gelatina de peixe. Contudo, face à dificuldade de se obterem fibras alinhadas a partir desta solução, optou-se por se prepararem soluções de gelatina a 25% em 90% de ácido acético em água destilada para produção de matrizes de gelatina.

Em geral, o processo de electrofiação a partir de soluções de quitosano torna-se bastante difícil, devido às propriedades destas soluções, entre as quais a sua elevada condutividade. Para contornar este problema, é comum adicionar-se PEO, de massa molecular elevada e em concentrações reduzidas, a soluções de quitosano, dadas as suas excelentes características de electrofiação, que permitem obter facilmente nanofibras. [61] Perante tais factos, as matrizes de gelatina e quitosano (Gt/CS) foram produzidas a partir de soluções contendo uma pequena fracção de PEO, de massa molecular de 2 000 000 g/mol.

Inicialmente preparou-se uma solução de 2.5%Gt, 2.5%CS e 0,25%PEO em 90% de AA em água destilada, mas a constituição da solução depois foi alterada para 2%Gt, 2%CS e 0,2%PEO em 90% de AA em água destilada. Tal alteração, deveu-se ao facto da solução inicial originar deposições pouco distribuídas no colector e fibras não uniformes com contos.

A constituição das soluções de gelatina e PCL foi 10%Gt e 10%PCL em 95% de AA em água destilada. As soluções foram produzidas adicionando-se a gelatina à água, depois os grânulos de PCL (pesados primeiro numa barquinha para pesagem) e finalmente o AA.

Imediatamente após preparação, todas as soluções foram mantidas em agitação num agitador magnético até dissolução completa dos polímeros. As soluções eram usadas aproximadamente 24h após a sua preparação e nunca excedendo um período de dois dias, por forma a minimizar a degradação dos polímeros.

### 3.1.2 Caracterização das soluções

Para determinar as características das soluções preparadas, realizaram-se medições de viscosidade e condutividade.

## Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade reológica de um fluido que reflecte o seu comportamento de escoamento sob a acção de uma tensão de corte externa. A viscosidade é um parâmetro da solução determinante no processo de electrofiação e na morfologia das fibras. Este parâmetro é fortemente influenciado pela concentração da solução polimérica e pela massa molecular do polímero, sendo que, quanto maior a concentração de um polímero, maior é a viscosidade da solução e, quanto maior for a massa molecular do polímero, maior é a viscosidade para uma mesma concentração [38]. A viscosidade da solução depende ainda da temperatura a que esta se encontra.

No processo de electrofiação, as forças viscoelásticas previnem a quebra do jacto, mantendo-o contínuo. A partir de determinado valor de viscosidade, é possível que haja estiramento do jacto sem que este quebre e sem a formação de contas. Se a viscosidade for muito baixa, não é possível a formação de uma fibra contínua, enquanto que, se for demasiado elevada, é necessária uma tensão aplicada elevada para dar origem ao jacto [38].

Para a caracterização reológica das soluções utilizou-se um reómetro rotacional (Malvern Instruments, Bohlin Gemini HR<sup>nano</sup>), com geometria de cone e prato (40 mm e 2° de inclinação). As medições da viscosidade das soluções ocorreram à temperatura de 25°C, em regime estacionário. Mediu-se a viscosidade das 4 soluções utilizadas na parametrização do processo de electrofiação. As medições da viscosidade das soluções utilizadas na produção das matrizes em estudo e a da solução aquosa de gelatina foram realizadas cerca de 1 e 2 dias após a preparação das soluções, respectivamente.

## Condutividade

A condutividade indica a capacidade de uma solução transportar cargas. A condutividade é outro parâmetro da solução que influencia fortemente o processo de electrofiação, e que depende principalmente do solvente da solução. Soluções com maior condutividade possibilitam que exista maior quantidade de cargas transportadas pela fibra, o que provoca maior estiramento da fibra, devido a uma maior repulsão electrostática e a uma maior zona de instabilidade. Assim, mais finas serão as fibras depositadas e menos provável será a ocorrência da formação de contas, contrariamente ao que se sucede com soluções de baixa condutividade. Por outro lado, na presença de fortes campos eléctricos, soluções com elevada condutividade podem conduzir à formação jactos múltiplos, devido à elevada repulsão electrostática [38].

A medição da condutividade das soluções foi efectuada por um condutímetro (HANNA Instruments HI 4521). As soluções foram preparadas cerca de 24h antes das medições. Os valores de condutividade foram registados para a temperatura de 25°C.

### 3.1.3 Montagem experimental dos Sistemas de Electrofiação

Neste trabalho foram utilizados dois sistemas de electrofiação distintos, cujas montagens experimentais são ilustradas nas Figs.3.1 a 3.3.

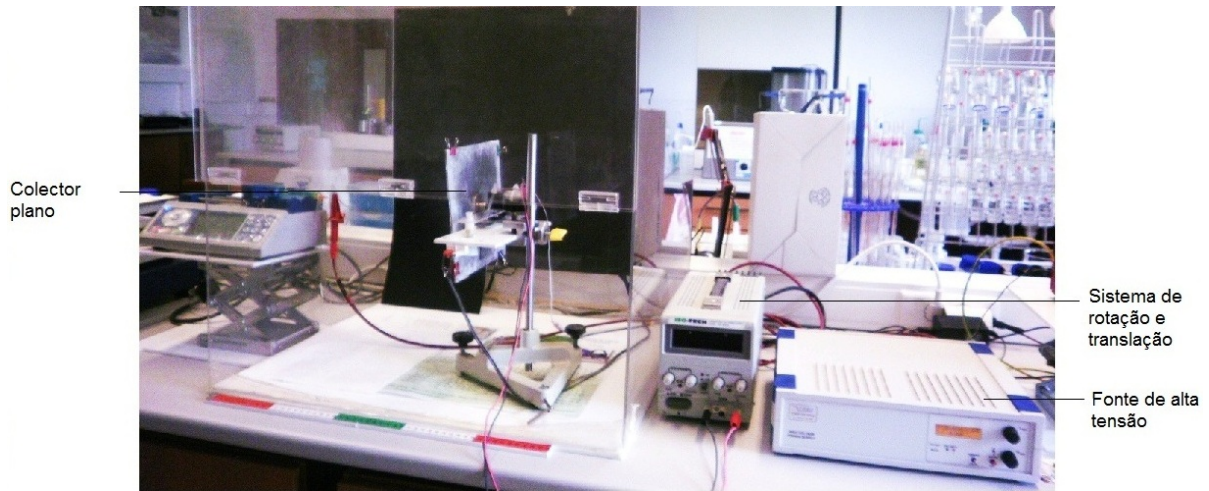


Figura 3.1: Sistema de electrofiação com colector plano



Figura 3.2: Pormenor do sistema de electrofiação com colector plano



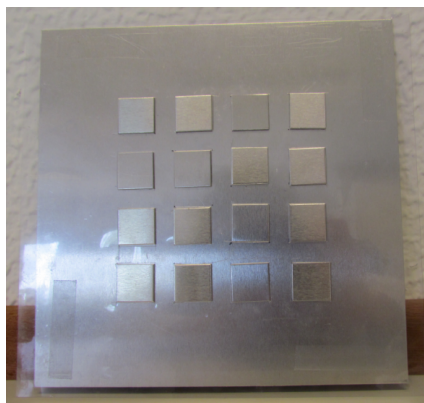
Figura 3.3: Sistema de electrofiação com colector cilíndrico rotatório



Os componentes principais utilizados nestas montagens são uma fonte de alta tensão (construída no Grupo de Engenharia de Tecidos - GREAT) que permite aplicar uma tensão máxima de 30kV, uma bomba injetora, onde é colocada uma seringa graduada de 5ml e diâmetro interno de 12.70mm (BBRAUN In-jekt®), acoplada com uma agulha de calibre 23G (diâmetro interno de 0,33 mm) e um colector ligado à terra. À agulha liga-se um crocodilo fixo à ponta do cabo que estabelece a ligação à fonte de tensão. Os valores dos parâmetros ambientais foram sempre monitorizados por medidor de humidade e temperatura (Rotronic, 8303 Basserdorf).

O colector plano metálico de 20x20cm é suportado por um sistema que permite estabelecer movimentos lentos de rotação e translação na horizontal, o que permite obter deposições mais uniformes que as obtidas com o colector estático.

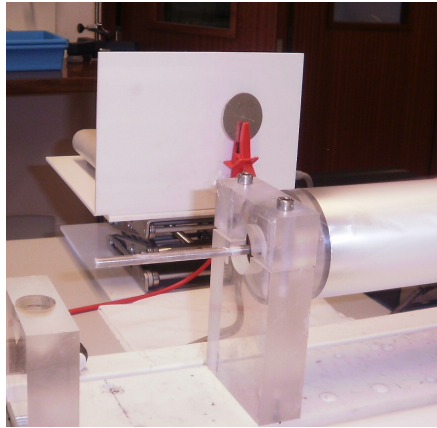
Com vista a depositar, sobre lamelas quadradas, matrizes de nanofibras para avaliação do grau de reticulação, foram fixos no colector plano 16 quadrados metálicos de 2x2cm, conforme se apresenta na Fig.3.4. A fixação foi feita com fita condutora de grafite com espaçamentos de 1cm entre quadrados. Colocou-se uma folha de acetato a cobrir e, assim, isolar todo o espaço além dos quadrados metálicos usando fita cola de dupla face. A fixação das lamelas aos quadrados metálicos foi assegurada por uma pequena gota de água entre eles. Para se obterem fibras sobre todas as lamelas, foi ligado o sistema de movimentos de rotação e translação do colector.



**Figura 3.4:** Colector plano construído para colocação de lamelas quadradas

O colector cilíndrico (construído no GREAT) utilizado neste trabalho tem 7cm de diâmetro e 22cm de comprimento, e tem um sistema que permite estabelecer um movimento rotacional e translacional. A velocidade de rotação é regulável, até ao máximo de 4000rpm, o que permite obter fibras com diferentes graus de alinhamento.

No caso do sistema de electrofiação com o colector cilíndrico, para alterar a configuração do campo eléctrico por forma a direccionar mais as fibras para o colector, foi sempre inserido um pequeno disco metálico na agulha, conforme ilustra a Fig.3.5.



**Figura 3.5:** Disco metálico na agulha do sistema de electrofiação com coletor cilíndrico

### 3.1.4 Electrofiação das soluções

Numa fase inicial, foi estudado o processo de electrofiação para as diferentes composições das soluções poliméricas por forma a estabelecer um conjunto de parâmetros que permitisse obter fibras. Para uma primeira análise da morfologia das fibras, obtiveram-se deposições no colector plano, ao qual foi presa com molas uma placa metálica forrada com papel de alumínio. Com os vários parâmetros de electrofiação testados, deixou-se o processo decorrer durante aproximadamente 5min e de seguida, foram obtidas imagens de microscopia óptica das deposições num microscópio óptico (MO) (Nikon Eclipse LV100). Foi então observado o aspecto das deposições para concluir sobre a influência dos parâmetros de produção utilizados na morfologia das fibras.



**Figura 3.6:** Microscópio óptico Nikon Eclipse LV100

Para cada solução foi selecionado um conjunto de parâmetros para se proceder às deposições no colector cilíndrico rotatório. Antes de efectuar cada deposição, o colector cilíndrico foi sempre coberto com papel de alumínio. Os parâmetros selecionados no colector estático foram validados para este colector. Adicionalmente, procedeu-se ao estudo da influência da velocidade de rotação do colector na morfologia das fibras, recorrendo novamente a imagens de microscopia óptica.

Para a produção de matrizes para a realização das culturas celulares, colaram-se lamelas circulares de 12mm de diâmetro, com fita cola de dupla face, sobre o papel de alumínio. Assim, as matrizes foram depositadas sobre as lamelas, dispostas ao longo de toda a superfície central do colector cilíndrico. O papel de alumínio foi recortado rente aos limites das lamelas, as quais depois foram soltas do papel.

### 3.1.5 Reticulação das matrizes

Conforme anteriormente referido no capítulo 2, embora a gelatina seja um biopolímero com potencial para aplicações em engenharia de tecidos, apresenta algumas propriedades mecânicas menos favoráveis e, no caso da gelatina de peixe, total dissolução em água à temperatura ambiente, necessitando assim de reticulação. A reticulação consiste basicamente no estabelecimento de ligações covalentes entre cadeias poliméricas. Um maior grau de reticulação permite aumentar a rigidez da estrutura e esta torna-se menos solúvel.

A reticulação pode ser realizada através vários métodos, incluindo tratamentos físicos, como são, por exemplo, o tratamento desidrotérmico (DHT, do inglês *dehydrothermal treatment*) e por irradiação com ultravioleta (UV), ou através de tratamentos químicos por acção de alguns agentes reticulantes tais como o formaldeído, o glutaraldeído (GTA) e a genipina. [51, 62, 63] Geralmente, os tratamentos físicos resultam num grau de reticulação mais baixo relativamente aos tratamentos químicos, pois a reacção ocorre basicamente na superfície dos materiais. [51]

Dado que todas as matrizes produzidas neste trabalho têm na sua composição gelatina, procurou-se um método de reticulação para a totalidade das matrizes. Escolheu-se reticular as matrizes com vapor de soluções de GTA em água. Porém, este tratamento pode tornar as matrizes citotóxicas e alterar a morfologia das fibras. [62, 63] Assim, decidiu-se testar uma combinação de um método físico com o GTA. O DHT é promovido pela desidratação das nanofibras de gelatina, o que é conseguido através do aquecimento a baixa pressão. O DHT processa-se a temperaturas muito elevadas (superiores a 100°C) e portanto, muito superiores ao ponto de fusão do PCL, pelo que não pode ser utilizado com as matrizes de Gt/PCL. Perante estes factos, optou-se por submeter matrizes de gelatina a irradiação UV antes da reticulação com GTA. Assim, espera-se que a irradiação UV promova alguma reticulação e possibilite a redução da concentração de GTA necessária.

### Reticulação com Radiação Ultravioleta

A irradiação UV de um polímero tanto pode promover a formação das ligações como resultar na clivagem das cadeias. Os resultados de um estudo de Bath *et al.* relativo ao efeito da radiação ultravioleta (UV) em algumas propriedades da gelatina de peixe indicam a possibilidade de utilizar irradiação UV para melhorar a resistência e a reticulação da gelatina [64].

Yokoni *et al* investigaram o efeito da irradiação de matrizes e filmes de colagénio com

doses de radiação UV de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  a  $35\text{J}/\text{cm}^2$  na solubilidade e verificaram que esta tem uma diminuição significativa a partir de  $15\text{J}/\text{cm}^2$  [65].

A irradiação UV foi efectuada no aparelho CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP - Ultra-Violet Products, Ltd.), que tem no seu interior 5 lâmpadas de 8 W que emitem radiação UV com comprimento de onda 254 nm [66].

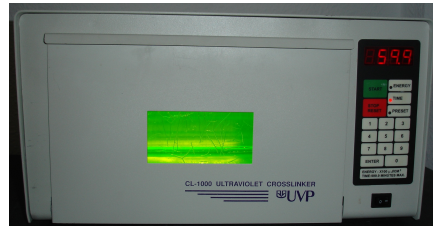


Figura 3.7: Aparelho CL-1000 UV Crosslinker

### Reticulação com Vapor de Glutaraldeído

Como já referido anteriormente, a necessidade de reticulação deve-se à presença de fibras de gelatina nas matrizes em estudo. Portanto, foram analisadas amostras de gelatina sujeitas a diferentes tempos de exposição a vapor de GTA. O tratamento de nanofibras com vapor de GTA é simples e possibilita a realização da reticulação num período de tempo relativamente curto [62].

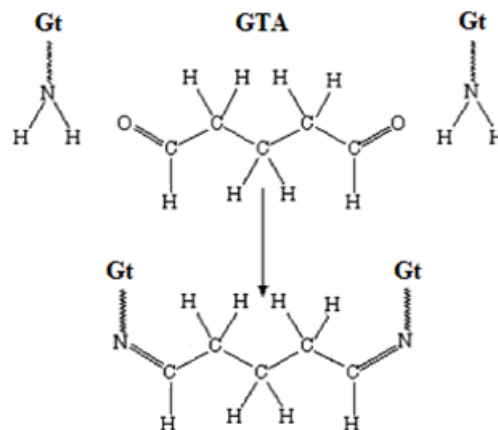


Figura 3.8: Mecanismo da reacção da reticulação da gelatina por acção do GTA [67] (adaptado)

O glutaraldeído, cuja fórmula química é  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ , é um dialdeído saturado considerado tóxico. A reacção de reticulação ocorre entre os grupos aldeído do GTA e os grupos amina da gelatina [62, 63]. Conforme ilustra a Fig.3.8, é a presença de dois grupos aldeído ( $\text{HC}=\text{O}$ ) que possibilita a reticulação, devido à formação de duas bases de Schiff, por ligação com aminas livres dos resíduos de lisina e hidroxilo-lisina na gelatina [67]. O CS, por pos-

suir o mesmo tipo de grupos amina, irá também sofrer reticulação durante o tratamento das matrizes de Gt/CS. É ainda de referir, que a formação de grupo aldimina (CH=N) confere a cor amarelada às amostras reticuladas [68].

### 3.1.6 Avaliação da Perda de Massa

A determinação do grau de reticulação das amostras em função do tempo de reticulação foi efectuada através da avaliação da perda de massa das mesmas. O grau de reticulação ( $GR$ ) relaciona-se com a perda de massa ( $PM$ ) segundo a equação 3.1. Por sua vez, a perda de massa é dada pela diferença relativa entre a massa inicial da amostra,  $m_{inicial}$ , e a massa dessa mesma amostra depois de ter permanecido em água durante algum tempo e após total evaporação da água absorvida,  $m_{seca}$ .

$$PM = 1 - GR = \frac{m_{inicial} - m_{seca}}{m_{inicial}} \quad (3.1)$$

Os parâmetros da reticulação considerados foram basicamente a concentração de GTA na solução aquosa, o tempo de exposição e a temperatura em que decorre o processo. Depois de optimizados os parâmetros do processo, o tratamento com GTA e a avaliação da perda de massa compreenderam os seguintes passos:

1. Antes da reticulação as amostras das matrizes foram mantidas no exsiccador em vácuo durante aproximadamente 2 dias;
2. Depois, numa hote, colocaram-se as amostras num recipiente que permitisse um bom isolamento quando fechado, um exsiccador. Colocou-se um cristalizador com 7cm de diâmetro com 10ml da solução de GTA (Sigma-Aldrich), a 50% em água destilada, no centro desse exsiccador e este num forno (Binder) à temperatura de 40°C (ver Fig.3.9);
3. Após o tempo de reticulação, as amostras ficaram no exsiccador em vácuo durante aproximadamente 3 dias para extrair possíveis vestígios de GTA não reagido das matrizes;
4. Pesaram-se as amostras;
5. Seguidamente as amostras foram imersas em água destilada e assim mantidas no agitador orbital (SK-330-Pro) durante 5h;
6. Depois de aproximadamente 20h a secar ao ar, mantiveram-se as amostras durante 2h no exsiccador em vácuo antes da pesagem para avaliação da perda de massa, para garantir condições semelhantes na pesagem das matrizes;

Na preparação das matrizes para cultura celular apenas foram executados os passos 1 a 3.

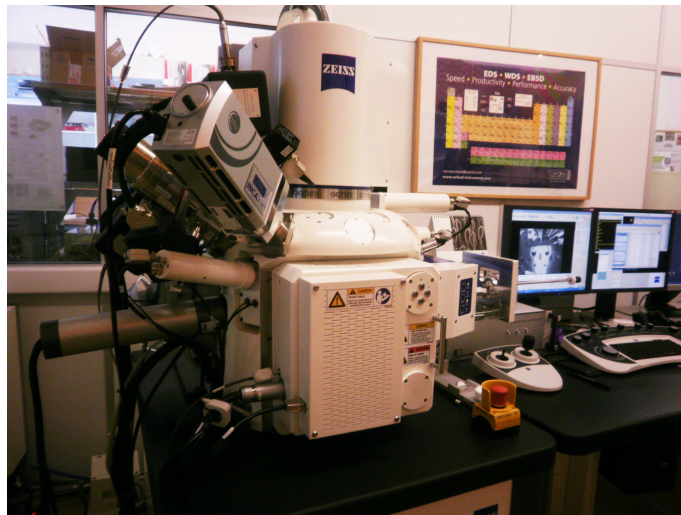


**Figura 3.9:** Forno com exsicador contendo as amostras e o cristalizador com solução de GTA

## 3.2 Caracterização das matrizes

### 3.2.1 Análise da morfologia das fibras

A morfologia das matrizes produzidas por electrofiação, nomeadamente, o diâmetro e alinhamento das fibras, foi avaliada através da análise de imagens de microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês *Scanning Electron Microscope*), recorrendo ao programa *ImageJ*. As imagens de SEM foram obtidas recorrendo a um equipamento Zeiss Auriga.



**Figura 3.10:** Zeiss Auriga Scanning Electron Microscope

Na técnica de microscopia electrónica de varrimento faz-se incidir um feixe de electrões sobre a amostra. Na sequência da interacção destes electrões com os átomos que compõem essa mesma amostra resultam electrões retrodispersos de alta energia, resultantes de dispersões elásticas, electrões secundários, resultantes de dispersões inelásticas e processos Auger, fotões

de alta energia (Raios X) e fótons na banda do visível (catodoluminescência). Dentro dos sinais emitidos pela amostra os mais importantes para a obtenção de imagem provêm dos electrões secundários e/ou dos electrões retrodispersos. Estes serão detectados pelo detector e o sinal é amplificado, e conseqüentemente, forma-se uma imagem.

Analísaram-se amostras nas condições de pós-produção, pós-reticulação e pós-lavagem, de matrizes de Gt (alinhas), Gt/CS (alinhas), Gt/PCL alinhadas, semialinhadas e desalinhas. Previamente, estas amostras foram colocadas sobre a fita de carbono que revestia o porta-amostras. Depois, as amostras foram revestidas com uma camada fina da liga ouro-paládio 80-20 por pulverização catódica e, finalmente, o porta-amostras foi colocado em vácuo no interior do SEM.

### Diâmetro das fibras

A medição dos diâmetros das fibras foi efectuada a partir de imagens de SEM, recorrendo ao programa *ImageJ*. Efectuaram-se 30 medições dos diâmetros das fibras de matrizes de Gt e Gt/CS alinhadas, bem como de Gt/PCL para os vários graus de alinhamento em estudo.

### Alinhamento das fibras

A anisotropia de uma matriz fibrosa desempenha um papel fundamental na determinação das propriedades dos materiais. O alinhamento das fibras de um suporte celular neuronal influencia também, tanto a direcionalidade como a dinâmica do crescimento das neurites, como demonstraram Chow *et al.*, por exemplo, num estudo utilizando matrizes alinhadas de polidioxanona [69]. A medida objectiva e quantitativa do grau de alinhamento das fibras permite correlacionar graus de anisotropia com o comportamento mecânico e biológico de uma dada matriz fibrosa.

Neste sentido, em particular para determinar a anisotropia de fibras resultantes de electrofiação, têm sido utilizados métodos baseados na transformada rápida (ou discreta) de Fourier (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*). Ayres *et al.* descrevem em vários estudos a aplicação deste método na caracterização do alinhamento das fibras de gelatina para diferentes condições [70, 71, 72]. Chow *et al.* também utilizam a FFT no estudo mencionado anteriormente [69].

A FFT converte a informação contida numa imagem do espaço real para o espaço da frequência [73]. A imagem resultante da FFT - o espectro de Fourier - apresenta, numa representação polar, pixéis cuja distribuição das intensidades, numa escala de cinzentos, reflecte o grau de alinhamento das fibras da imagem original. A soma ao longo da direcção radial das intensidades dos pixéis no espectro de Fourier, representada em função do ângulo polar, permite construir um gráfico de distribuição de intensidades que reflecte o alinhamento das fibras no espaço real. Os ângulos de orientação preferencial identificados na imagem original estão relacionados com a posição de picos proeminentes no gráfico de intensidade [70, 72].

Assim, a análise do alinhamento das fibras das diferentes composições estudadas foi efectuada, a partir das imagens de SEM, utilizando este método. Foram calculados os espectros de Fourier das imagens de SEM das várias amostras recorrendo ao programa *ImageJ*, e deles extraídos o gráfico de distribuição de intensidades, usando um plug-in desenvolvido pelo GREAT tendo por base o *Oval Profile Plug-in* de Bill O'Connell. Adicionalmente e usando o mesmo programa *ImageJ*, foram medidos os ângulos de orientação das fibras nas matrizes obtidas com o colector a rodar à velocidade máxima. Os respectivos histogramas foram comparados com os gráficos de distribuição de intensidades, obtidos pelo método da FFT.

### 3.2.2 Análise química das matrizes

A avaliação das ligações químicas (grupos funcionais) existentes nas matrizes produzidas para as diferentes composições e das ligações provenientes da reticulação das matrizes Gt e Gt/CS, foi efectuada por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier com modo de reflectância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Utilizou-se um espectrofotómetro (Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR) com o acessório de ATR (Thermo Scientific Smart iTR<sup>TM</sup>). Foram obtidos também os espectros de amostras de quitosano e de PCL, para posterior comparação com os das amostras compósitas (Gt/CS e Gt/PCL). Para tal, foram preparados previamente filmes de quitosano, um dos quais foi reticulado, e um filme de PCL.

O termo Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier tem origem no facto desta técnica recorrer à transformada de Fourier para converter os dados para o espectro real. Esta técnica baseia-se no facto de ligações moleculares vibrarem em frequências diferentes. A indução da excitação das ligações por absorção da energia da luz permite obter um espectro vibracional de determinada amostra e assim identificar grupos característicos.



**Figura 3.11:** FTIR Thermo Nicolet 6700



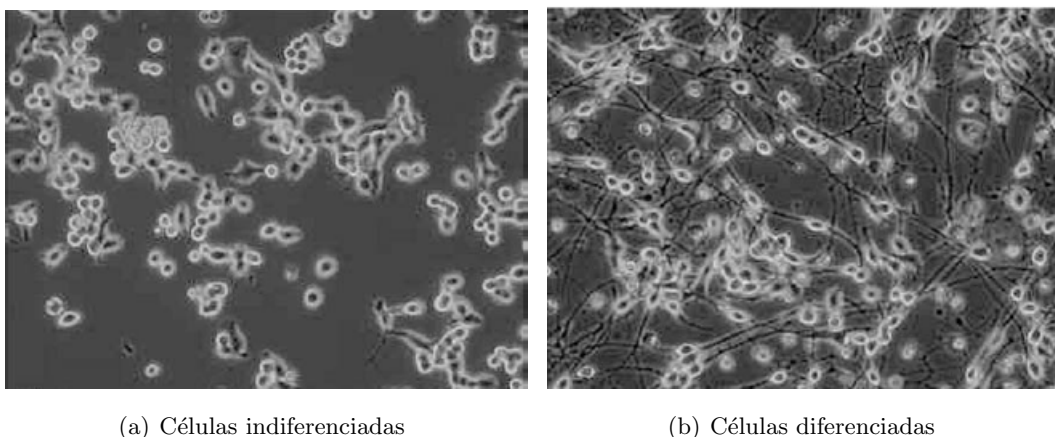
### 3.3 Cultura Celular

A cultura de células constitui uma ferramenta essencial como abordagem prévia à experimentação animal. A combinação de células com materiais pode também ser adoptada como estratégia regenerativa. Neste caso, a cultura de células *in vitro* ocorrerá no material a implantar. Neste trabalho foram realizadas culturas celulares, visando avaliar *in vitro* se os materiais usados e estruturas desenvolvidas são adequados em termos de adesão, viabilidade e desenvolvimento celular para o fim a que se destinam.

As culturas celulares foram realizadas na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), sendo utilizadas células N1E-115 (HPA Culture Collections-ECACC, Reino Unido), fornecidas pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa (FCM-UNL). As células N1E-115 pertencem a uma linhagem celular imortalizada, isolada a partir do clone adrenérgico derivado do neuroblastoma C-1300, um tumor de murganho.

Embora as linhas celulares, ao contrário das células primárias, retenham poucas características das células *in vivo*, apresentam como vantagem a sua proliferação ilimitada ou limitada a um número elevado de divisões celulares (aproximadamente 30) [74]. Para além disso, as linhas celulares, por serem mais homogéneas e mais estáveis são, portanto, mais reprodutíveis que as populações de células primárias. Permitem assim, estabelecer comparações entre materiais mais independentes da variabilidade associada a recolhas de células provenientes de diferentes animais. Permitem ainda evitar o sacrifício de animais.

As células N1E-115 constituem um modelo para estudos de células neuronais, pois na presença de 1.5% de dimetilsulfóxido (DMSO) no meio, adquirem protrusões características de neurónios [75]. A Fig.3.12 ilustra a diferença na morfologia entre as células N1E-115 indiferenciadas (em meio de crescimento) e diferenciadas (em meio de diferenciação).



(a) Células indiferenciadas

(b) Células diferenciadas

**Figura 3.12:** Células N1E-115 [76] (adaptado)

Consideram-se deposições de fibras das várias composições (Gt, Gt/CS e Gt/PCL) obtidas por electrofiação no colector cilíndrico, à velocidade de rotação de 4000 rpm (fibras essencialmente alinhadas). Para a mistura Gt/PCL foram ainda produzidas matrizes para

velocidades de rotação do colector de 2000rpm (fibras semialinhadas) e 500rpm (fibras desalinhadas). Procedeu-se de seguida à reticulação das matrizes em vapor de GTA a 50% durante 4h.

As condições de esterilidade nas culturas de células são imperativas, de modo a evitar contaminações [77]. Como tal, utilizaram-se materiais adquiridos já esterilizados e todos os frascos de meio e outros reagentes e materiais foram limpos com etanol a 70% e somente abertos dentro da câmara de fluxo laminar horizontal. As lamelas com as matrizes foram esterilizadas conforme o protocolo do Apêndice A.1.

A utilização de antibióticos no meio de cultura é também relevante, pois inibe o crescimento de microorganismos prejudiciais às células. As células são sensíveis a diversos factores, tais como o pH, a temperatura e a composição do meio, pelo que é extremamente importante manter todos estes factores controlados [77]. Para evitar choques térmicos, todos os reagentes usados na manutenção das células foram previamente aquecidos em banho-maria (PolyScience) a 37°C. As células foram mantidas numa incubadora de CO<sub>2</sub> (Nuair) a 37°C, com uma atmosfera húmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após descongelamento das células N1E-115, estas foram cultivadas em meio de crescimento, constituído por 90% de DMEM+GlutaMAX<sup>TM</sup> (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco), suplementado com 10% de FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*) (Gibco) e 0,1% de antibiótico - penicilina e estreptomicina (Gibco), em frascos de cultura T25, de 25cm<sup>2</sup>, tratados para células aderentes.

Para induzir a diferenciação celular, mudou-se o meio de crescimento do T25 para meio de diferenciação. Este era constituído por 96% de DMEM+GlutaMAX<sup>TM</sup>, 2,5% de FBS, 1,5% de DMSO (Merck) e 0,1% de antibiótico - penicilina e estreptomicina. A redução da percentagem de soro no meio de cultura e a adição de DMSO faz parar o crescimento e induz a diferenciação das células N1E-115. As mudanças de meio foram efectuadas de 2 em 2 dias.

As células proliferam nos frascos de cultura, onde aderem devido à secreção de proteínas de adesão. O crescimento celular é limitado pelo contacto entre células que tendem a soltar-se perto da confluência [77]. Devido a este facto, quando as células atingiram um estado de confluência próximo de 70-80%, efectuou-se a sementeira nas matrizes em placas de poços ou uma passagem (subculturas). Primeiro, o meio dos frascos da cultura inicial é retirado e a monocamada celular é lavada com solução tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*). Este procedimento é essencial para remover os vestígios de meio com soro, o qual inibe a acção da tripsina utilizada no passo seguinte. A tripsina é um enzima que quebra a ligação das proteínas de adesão e, assim, permite soltar as células do frasco. Após a lavagem, adicionou-se a tripsina-EDTA (Gibco) e agitou-se ligeiramente o frasco de cultura de forma a descolar a monocamada de células.

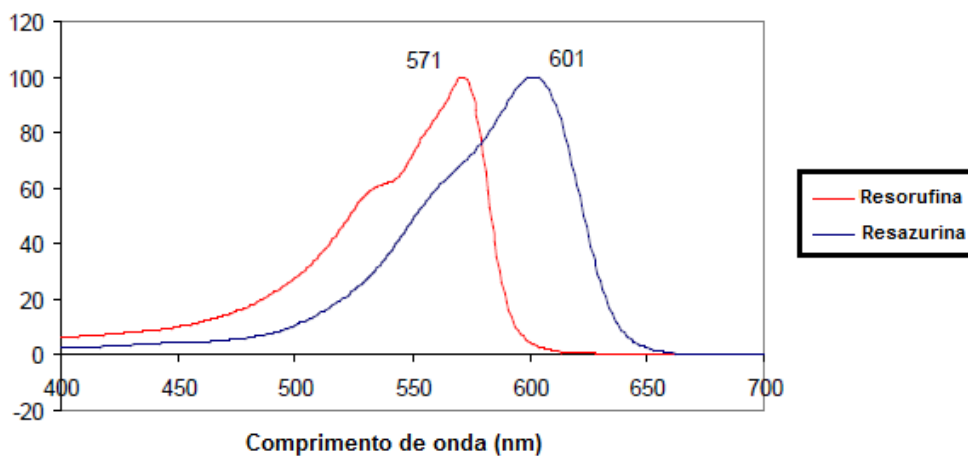
Antes e após qualquer procedimento, as células foram observadas no microscópio óptico invertido com contraste de fase (Olympus CK2) para averiguar o seu estado.



**Figura 3.13:** Microscópio óptico invertido Olympus CK2

### 3.3.1 Avaliação da viabilidade celular

Para a realização dos testes de viabilidade celular utilizou-se o reagente PrestoBlue®. Trata-se de uma solução à base de resazurina, que permite quantificar a viabilidade das células relativamente à de um controlo. A indicação relativa da actividade metabólica baseia-se na capacidade das células vivas reduzirem a resazurina, um composto azul que não apresenta fluorescência intrínseca, a resorufina, vermelha e altamente fluorescente. Assim, as alterações da cor e fluorescência associadas a este processo, podem ser detectadas através de medidas de fluorescência ou de absorvância, sendo os valores obtidos proporcionais ao número de células viáveis presentes no meio [78, 79]. Neste trabalho foram efectuadas medições de absorvância. Para tal, recorreu-se a um leitor de absorvância (Tecan Spectra Rainbow) de placas de 96 poços, tendo em conta as características dos espectros apresentados na Fig.3.14. O comprimento de onda da leitura de absorvância foi de 750nm e de referência de 600nm.



**Figura 3.14:** Espectro de absorvância da resazurina e resorufina [79] (adaptado)

### 3.3.2 Observação dos núcleos e do citoesqueleto

A observação dos núcleos e do citoesqueleto das células foi efectuada por microscopia de fluorescência, utilizando um microscópio de fluorescência (MF) (Olympus BX60). Os procedimentos prévios à observação incluem a fixação das células e a marcação fluorescente.

Para marcação dos núcleos foi utilizado o marcador específico DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Sigma-Aldrich) que se liga fortemente à molécula de DNA. Esta molécula atravessa a membrana celular sem a danificar, e é usada para visualizar os núcleos em células mortas ou vivas. Em microscopia de fluorescência, a molécula de DAPI é excitada com radiação ultravioleta e emite radiação na zona do azul.

O citoesqueleto das células foi marcado com faloidina Alexa Fluor®568, uma micotoxina que é frequentemente utilizada para observar os filamentos de actina em microscopia de fluorescência. A faloidina liga-se fortemente aos filamentos de actina e assim, evita a dissociação em moléculas individuais de actina (despolimerização) [14]. Quando acoplada a um fluoróforo, este emite fluorescência e, desta forma, permite a identificação dos microfilamentos de actina-F.

O protocolo seguido para fixação e marcação celular encontra-se pormenorizado no Apêndice A.4.



**Figura 3.15:** Microscópio de fluorescência Olympus BX60

## 3.4 Produção de filmes porosos

Tendo em vista a obtenção de um suporte para as fibras, procedeu-se à produção de filmes finos e porosos de PCL. A partir da estrutura polimérica constituída pelo filme e pelas fibras, será possível produzir tubos adequados à regeneração neuronal guiada. Como referido, a porosidade do suporte é um factor essencial.

Tsuji *et al.* produziram filmes a partir de soluções de PCL e PEO em diclorometano, nas quais ocorre separação de fases entre os dois polímeros. Verificaram que a evaporação muito lenta do solvente origina a formação no filme de domínios consideravelmente grandes de uma fase rica em PEO. A lavagem do PEO com água destilada dá origem a filmes porosos cujas características dependem da fracção PCL/PEO utilizada bem como da massa molecular

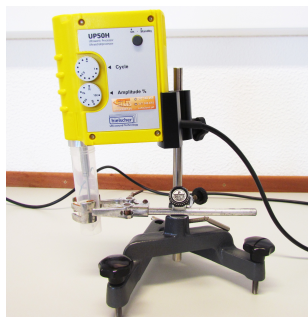
do PEO. A concentração total de polímero utilizada na solução foi sempre muito baixa (1g/dl) [80].

Como tal, a primeira abordagem seguida para a produção de filmes finos e porosos de PCL foi semelhante à acima descrita. Utilizaram-se soluções de PCL/PEO, PCL/PEG (Polietilenoglicol) ou PCL/PVP (Poli(vinilpirrolidona)) dissolvidos em diclorometano. Os materiais utilizados são apresentados na tabela 3.2. A escolha dos polímeros para além do PCL foi baseada na sua disponibilidade e dissolução em água. O PEG e o PEO permitiriam observar consequências da variação da massa molecular.

Prepararam-se soluções com diferentes concentrações e proporções de polímeros. Primeiro, foram sempre preparadas as soluções dos polímeros individualmente, em diclorometano e, após total dissolução sob agitação magnética, foram misturadas por forma a obter-se a concentração pretendida. Algumas destas misturas foram dissolvidas sob agitação magnética e outras, recorrendo a um sonicador (Dr. Hielcher GmbH, UP50H), de potência máxima de 50W, com um sonótrodo Micro tip MS2 [81]. Após total dissolução, foram depositadas sobre lâminas, as quais foram mantidas dentro de uma caixa fechada durante 1 semana para permitir uma lenta evaporação do solvente. Os filmes assim obtidos, após observação ao microscópio óptico, foram colocados em água destilada, numa caixa com divisórias, durante 24h, por forma a lavar os polímeros incorporados no filme de PCL. Decorrido esse tempo e, após secagem ao ar, foram novamente observados ao MO. Alguns dos filmes, aparentemente mais promissores no que diz respeito à quantidade e tamanho de poros, foram observados no SEM (Zeiss DSM 962).

**Tabela 3.2:** Materiais utilizados na preparação de filmes com separação de fases

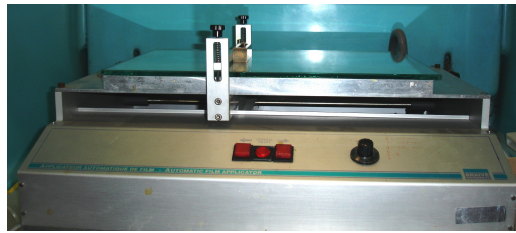
Material	Fornecedor	Fórmula Química	Massa Molecular [g/mol]
PCL	Sigma-Aldrich	$(C_6H_{10}O_2)_n$	70 000 - 90 000
PEO	Sigma-Aldrich	$(CH_2CH_2O)_n$	100 000
PEG	Merck-Schuchardt	$HO(C_2H_9O)_nH$	300
PVP	Sigma-Aldrich	$(C_6H_9NO)_n$	1 300 000
Diclorometano	Sigma-Aldrich	$CH_2Cl_2$	84.93



**Figura 3.16:** Sonicador UP50H

Outra abordagem alternativa utilizada, para a produção dos filmes finos e porosos de PCL, foi a técnica mista de prensagem a quente e lixiviação de sais. A técnica consiste em incorporar grânulos de sal (NaCl) num filme durante a fase de prensagem. Subsequente são abertos poros no filme por lixiviação do sal em água. A quantidade, granulometria e forma dos cristais do sal influenciam a porosidade.

Os filmes de PCL foram obtidos através do espalhamento de uma solução de PCL a 3% em diclorometano sobre vidro, recorrendo a um aplicador automático de filmes (BRAIVE Instruments), com auxílio de uma régua calibrada de  $500\mu\text{m}$  (ver Fig.3.17). O molde de prensagem foi coberto com uma camada de sal ( $100\text{-}200\mu\text{m}$ ) com superfície regular e o filme foi colocado por cima, ficando com as extremidades presas no molde. Por cima colocou-se novamente sal e efectuou-se uma pressão de aproximadamente 15bar durante cerca de 5min. Numa abordagem alternativa, prensaram-se a quente filmes de PCL entre pedaços de lixa com diferente granulometria.



**Figura 3.17:** Aplicador automático de filmes (BRAIVE Instruments)



**Figura 3.18:** Prensa - prensagem do molde com filme e sal

# 4

## Apresentação e Discussão de Resultados

### 4.1 Caracterização das soluções

As soluções utilizadas para electrofiação foram as seguintes:

- Solução de 40% Gt em água (S-GtA)
- Solução de 25%Gt+90%AA (S-GtAA)
- Solução de 2%Gt+2%CS+90%AA (S-Gt/CS)
- Solução de 10%Gt+10%PCL+95%AA (S-Gt/CS)

Na Fig.4.1 apresentam-se as curvas de viscosidade em função da taxa de corte para as várias soluções. Enquanto que as soluções de Gt apresentam uma zona de patamar para taxas de corte inferiores a  $100s^{-1}$ , as soluções de Gt/CS e Gt/PCL não apresentam zona de patamar para as taxas de corte consideradas. Na tabela 4.1 apresentam-se os valores da viscosidade de todas as soluções, para uma taxa de corte de  $1s^{-1}$ , bem como os valores da condutividade das mesmas, sendo que neste último caso a incerteza apresentada corresponde à resolução do aparelho de medida.

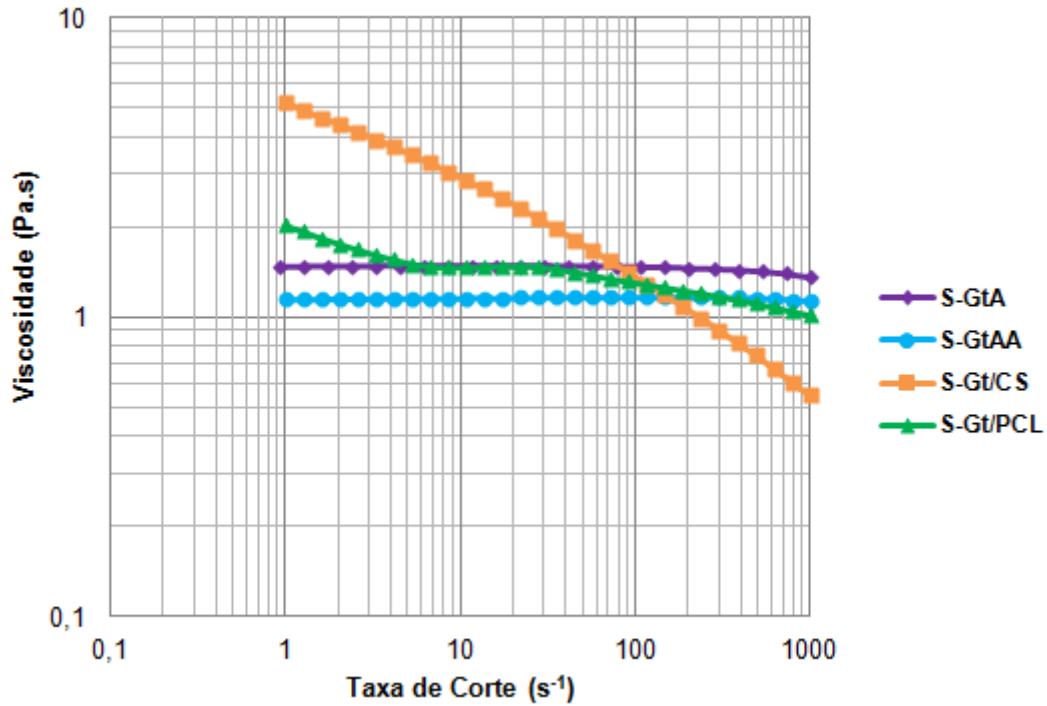


Figura 4.1: Curvas de viscosidade das soluções

Tabela 4.1: Viscosidade ( $\gamma=1s^{-1}$ ) e condutividade das soluções ( $T=25^{\circ}C$ )

Solução	Viscosidade (Pa.s)	Condutividade ( $\mu S/cm$ )
S-GtA	1.471	938.0 $\pm$ 0.1
S-GtAA	1.145	564.6 $\pm$ 0.1
S-Gt/CS	5.238	336.1 $\pm$ 0.1
S-Gt/PCL	2.031	126.2 $\pm$ 0.1



## 4.2 Produção das matrizes

### 4.2.1 Electrofiação

O trabalho iniciou-se com a realização de um estudo tendo em vista a avaliação do efeito de vários parâmetros no processo de electrofiação. Para cada solução, determinou-se um conjunto de parâmetros adequados para a produção de fibras com boas características morfológicas (forma e diâmetros regulares).

Os parâmetros de electrofiação incluídos neste estudo foram o caudal da solução, a distância da ponta da agulha ao colector e a tensão aplicada. Partiu-se de um conjunto de parâmetros já testados no GREAT em estudos anteriores, efectuados num colector plano, e variou-se individualmente cada um deles, mantendo os outros fixos. Os parâmetros foram depois otimizados para o colector cilíndrico, observando-se ainda o aspecto geral da anisotropia/alinhamento das fibras em função da velocidade de rotação do colector. No final da optimização estabeleceram-se os parâmetros que se apresentam na tabela 4.2.

**Tabela 4.2:** Parâmetros de electrofiação utilizados na produção das matrizes estudadas

Matriz	Solução	Caudal [ml/h]	Distância agulha-colector [cm]	Tensão [kV]
Gt	S-GtAA	0.3	25	15
Gt/CS	S-Gt/CS	0.3	25	18
Gt/PCL	S-Gt/PCL	0.3	25	12

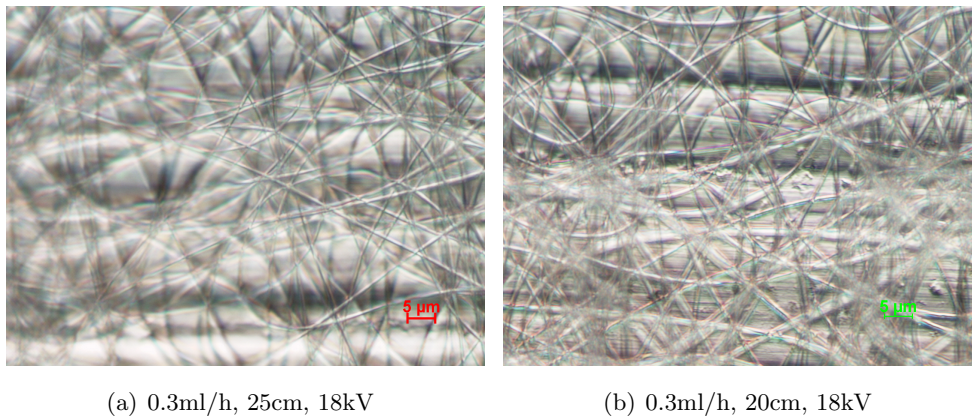
É de salientar que, as condições ambientais em que o processo se realiza têm também influência no mesmo. Tentou-se corrigir variações de temperatura e humidade relativa através do sistema de ar condicionado e recorrendo a um humidificador, mas com sucesso limitado.

### Matrizes de Gelatina

A solução S-GtA apresentou tendência para acumulação de gota na ponta da agulha para todos os parâmetros testados no colector plano. Independentemente desta observação, obtiveram-se fibras sem defeitos e de diâmetros regulares, como mostram as imagens de microscopia óptica da Fig.4.2.

No colector cilíndrico rotatório, o processo apresentou-se relativamente mais estável (sem grande acumulação de gota) para um caudal de 0.3ml/h, 20cm de distância entre a ponta da agulha e o colector e para uma tensão de 18kV. No entanto, as fibras apresentavam-se pouco alinhadas mesmo para as velocidades mais elevadas atingidas pelo colector, como evidencia a Fig.4.3.

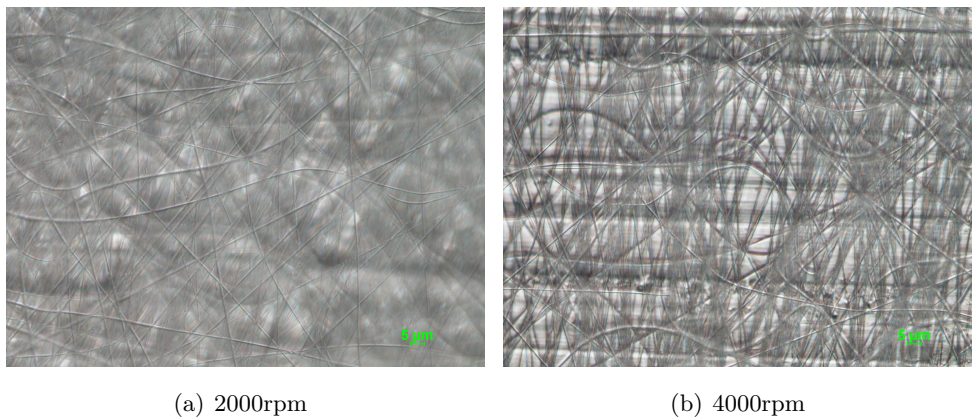
Perante estes resultados, decidiu-se usar uma solução de gelatina a 25% em ácido acético a 90% (S-GtAA), que tem uma condutividade mais baixa do que a solução anterior (ver tabela 4.1), com vista à obtenção de fibras com maior grau de alinhamento. Estabeleceram-se os valores dos parâmetros indicados na tabela 4.2 e variou-se a velocidade



**Figura 4.2:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução de S-GtA - Parâmetros iniciais e finais. Ampliação: 1000x

de rotação do colector de 250rpm a 4000rpm, aumentando sempre para o dobro do valor anterior.

As fibras produzidas a partir desta solução apresentam algum alinhamento a partir de 2000rpm, conforme ilustra a Fig.4.4(c). As fibras das matrizes de gelatina produzidas a 4000rpm (Gt-a) podem ser consideradas essencialmente alinhadas tendo em conta a Fig.4.4(d).

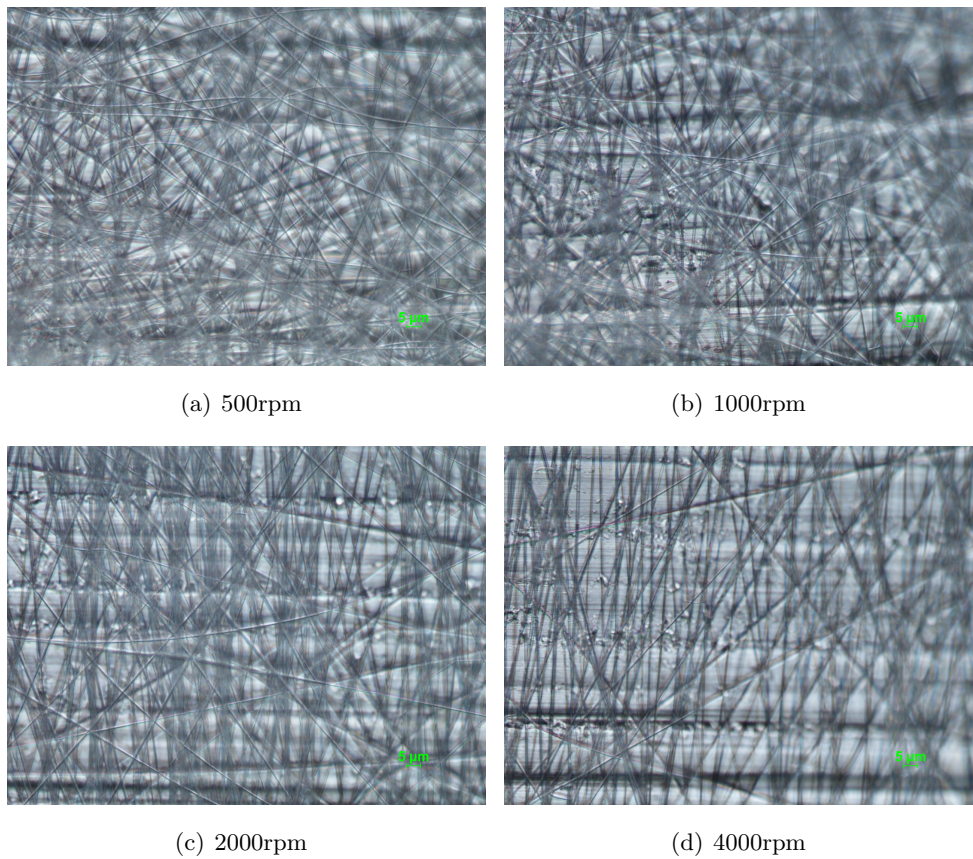


**Figura 4.3:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-GtA (0.3ml/h, 20cm, 18kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 500x

### Matrizes de Gelatina/Quitossano

O processo de electrofiação da solução S-Gt/CS no colector plano, para um caudal de 0.2ml/h, distância agulha-colector de 25cm e tensão de 18kV é estável e obtêm-se fibras sem defeito como ilustrado na Fig.4.5(a). Verificou-se que variações em torno destes parâmetros resultam, em geral, em deposições que preenchem uma área considerável do colector e o

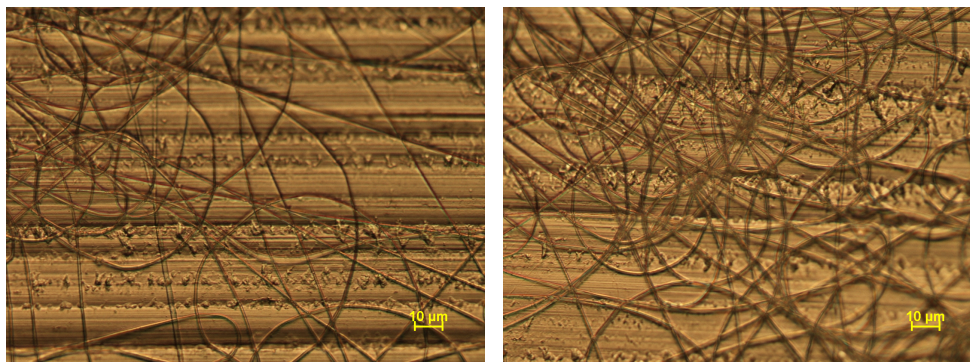
CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



**Figura 4.4:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-GtAA (0.3ml/h, 25cm, 15kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 500x

#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

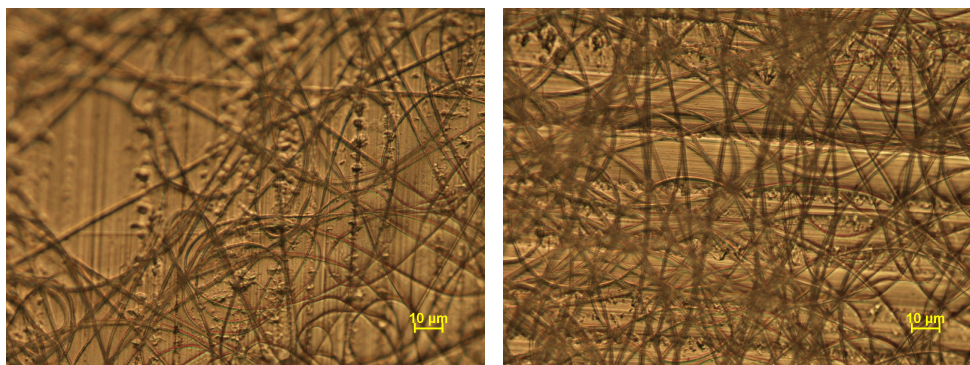
processo é estável. As Figs.4.5 a 4.7 ilustram efectivamente a influência de tais variações na morfologia das fibras. Observando a Fig.4.7 é evidente que o aumento do caudal provocou o aumento do diâmetro das fibras. Em todos os casos testados observam-se fibras com diâmetros regulares e sem contas.



(a) 0.2ml/h, 25cm, 18kV

(b) 0.2ml/h, 25cm, 16kV

**Figura 4.5:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação da tensão. Ampliação: 500x



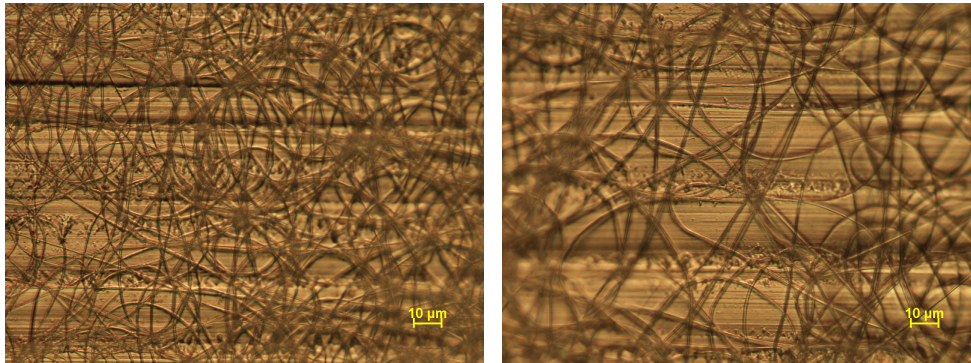
(a) 0.2ml/h, 20cm, 18kV

(b) 0.2ml/h, 30cm, 18kV

**Figura 4.6:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação da distância agulha-colector. Ampliação: 500x

No colector cilíndrico reajustou-se o caudal para 0.3ml/h e analisou-se a influência de diferentes velocidades (250, 500, 1000, 2000 e 4000rpm) na orientação das fibras recolhidas. Verificou-se que o alinhamento das fibras não era conseguido para velocidades de rotação do colector inferiores a 2000rpm, inclusive. Assim, as matrizes de Gt/CS com fibras essencialmente alinhadas (Gt/CS-a) foram produzidas com a velocidade regulada para 4000rpm. Na Fig.4.8 mostram-se fibras obtidas para duas velocidades de rotação do colector. Note-se que as linhas visíveis horizontalmente correspondem à topografia do papel de alumínio. O alinhamento vertical das fibras é maior para a velocidade de rotação mais elevada.

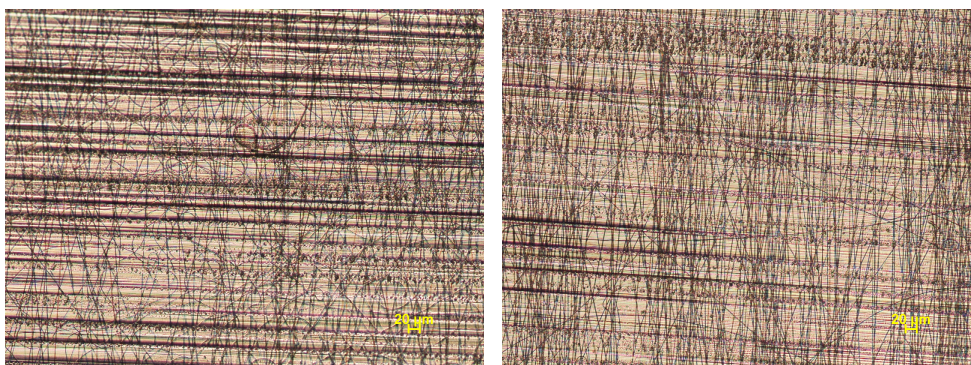
CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



(a) 0.1ml/h, 25cm, 18kV

(b) 0.3ml/h, 25cm, 18kV

**Figura 4.7:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS - Efeito da variação do caudal. Ampliação: 500x



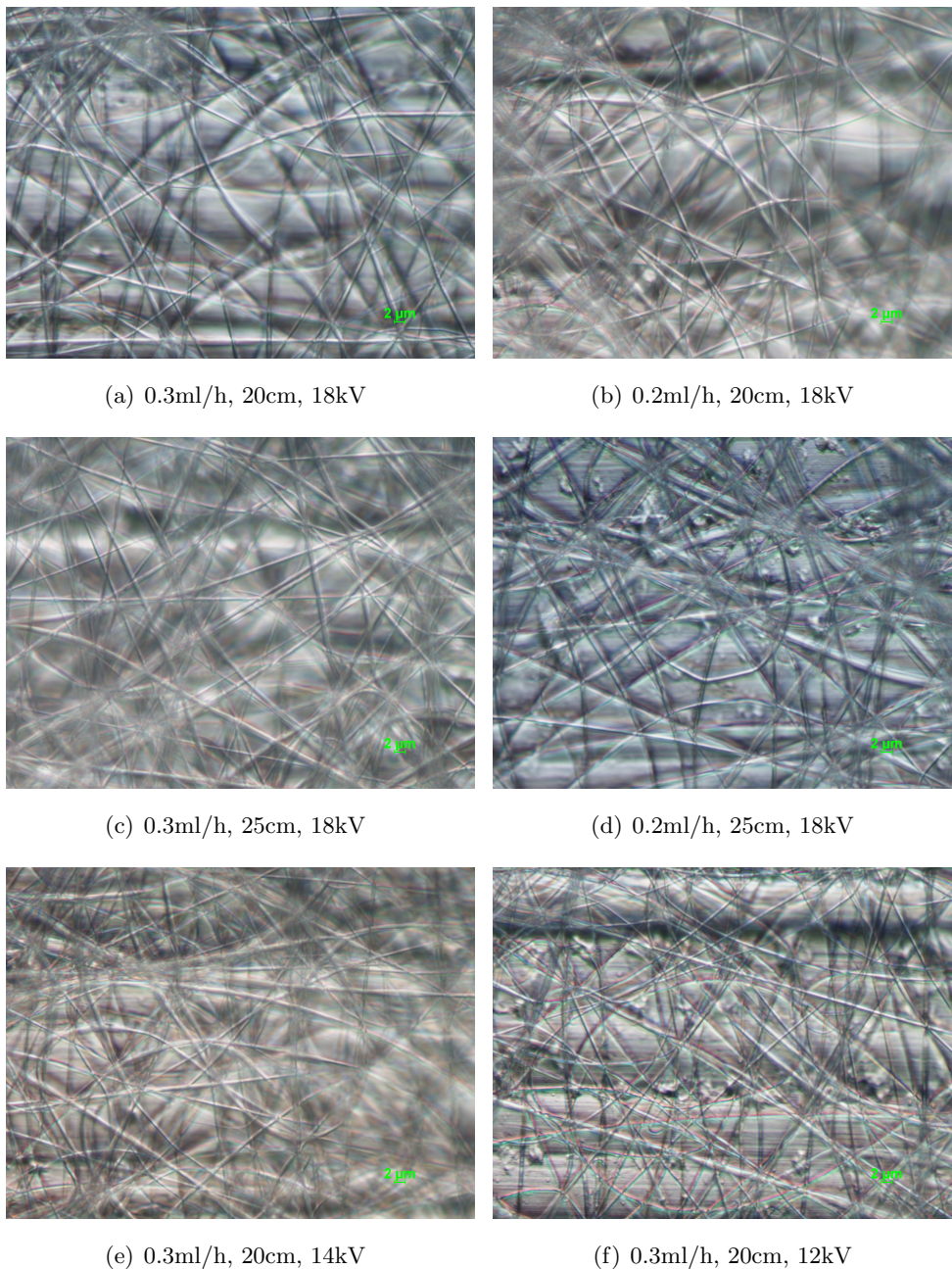
(a) 2000rpm

(b) 4000rpm

**Figura 4.8:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/CS (0.2ml/h, 25cm, 18kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 100x

### Matrizes de Gelatina/PCL

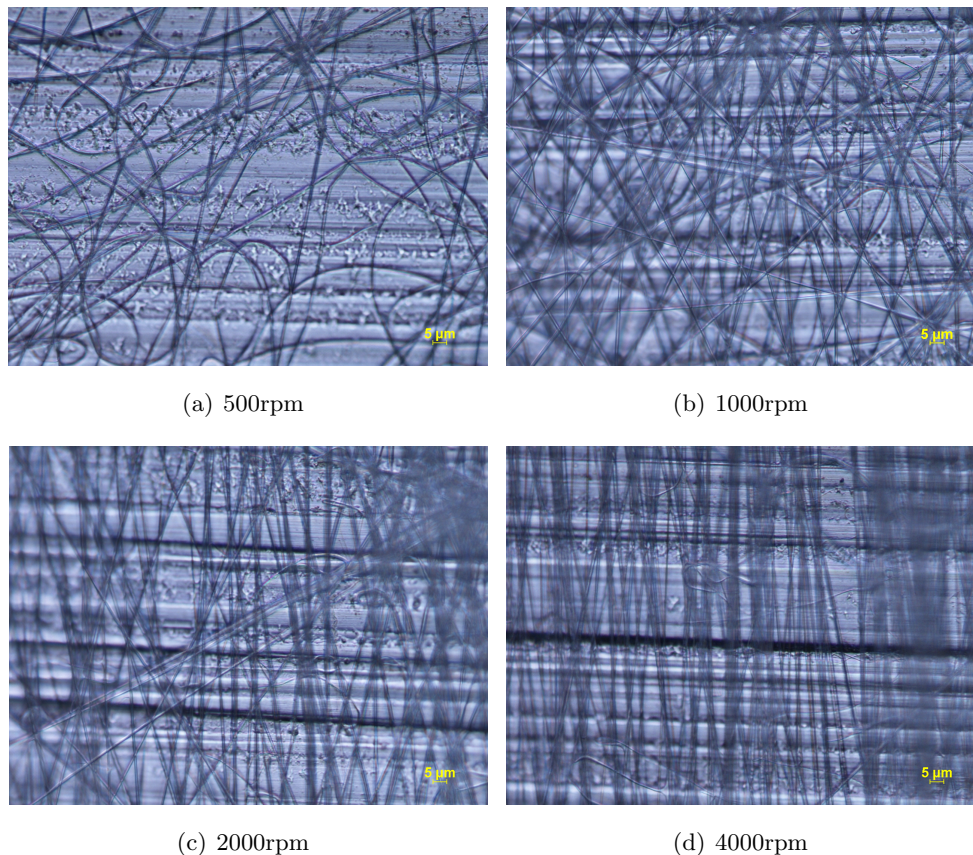
A escolha dos parâmetros para a electrofiação da solução S-Gt/PCL foi dificultada pelo facto de surgirem pequenas projecções nas deposições para os vários conjuntos de parâmetros testados. No que se refere à morfologia das fibras, elas apresentam-se regulares como mostra a Fig.4.9. Desta forma, procurou-se essencialmente estabelecer um conjunto de parâmetros que permitisse obter deposições sem projecções. No colector cilíndrico esta situação foi mais facilmente conseguida.



**Figura 4.9:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/PCL para vários conjuntos de parâmetros do processo. Ampliação: 500x

## CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Na Fig.4.10 é possível verificar o efeito da velocidade de rotação nas fibras de Gt/PCL. A partir de uma solução de 23% de PCL em ácido acético a 95% em água, consegue-se obter fibras alinhadas a baixas velocidades de rotação [82]. Neste caso, a solução possui 10% de Gt e 10% de PCL e, comparativamente à solução de 23% de PCL atrás referida (condutividade de  $1,30\mu\text{S}/\text{cm}$  [82]), a sua condutividade é superior ( $126.2\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Como já se tinha concluído para a solução de gelatina, a condutividade afecta significativamente o alinhamento. Embora a 2000rpm já seja evidente algum alinhamento, este é significativamente superior a 4000rpm, conforme se constata nas Fig.4.10(c) e 4.10(d).



**Figura 4.10:** Imagens de MO de fibras produzidas a partir de uma solução S-Gt/PCL (0.3ml/h, 20cm, 10kV) - Efeito da variação da velocidade de rotação. Ampliação: 500x

Entre todas as soluções consideradas neste trabalho, a solução S-Gt/PCL foi aquela que permitiu obter graus de alinhamento superiores para a velocidade máxima de rotação do colector. Assim, produziram-se matrizes de Gt/PCL para velocidades de rotação do colector cilíndrico de 500rpm, 2000rpm e 4000rpm. Estas matrizes foram designadas por desalinhas (Gt/PCL-d), semialinhadas (Gt/PCL-s) e alinhadas (Gt/PCL-a) respectivamente. A sua utilização nas culturas celulares permitirá verificar diferenças no comportamento celular que decorram do grau de orientação das fibras, presumivelmente na extensão e orientação dos prolongamentos das células neuronais.

Na produção das matrizes de Gt/PCL para cultura celular, utilizando o colectador cilíndrico rotatório, para os diferentes graus de alinhamento, os parâmetros do processo foram reajustados (0.3ml/h, 25cm, 12kV), para que este fosse mais estável durante as 2-3h em que decorria. Note-se que a configuração do campo eléctrico depende da geometria dos eléctrodos. O aumento do potencial possibilitou direccionar mais as fibras para o colectador.

#### 4.2.2 Reticulação e perda de massa

A avaliação da reticulação da gelatina, por acção da radiação UV e/ou por exposição a vapor de GTA, foi efectuada através da perda de massa de amostras quando imersas em água. Realizaram-se alguns estudos por forma a avaliar a eventual influência da pré-exposição das amostras de gelatina a radiação UV, e a avaliar a dependência da perda de massa no tempo de exposição e na concentração de GTA. O tempo escolhido para testar o efeito da exposição das matrizes a radiação UV antes da reticulação com GTA foi de 160min, o que corresponde a uma dose de  $20\text{J}/\text{cm}^2$ , baseado no estudo de Yunoki *et al* [65]. Para escolher a concentração de GTA, entre 5% e 50%, e averiguar o efeito da irradiação UV das matrizes antes da reticulação com GTA, efectuou-se um estudo para tempos de exposição a vapor de GTA de 2h e 5h. Neste estudo inicial, cada grupo de 8 amostras foi colocado à temperatura ambiente num recipiente de vidro que continha no centro um frasco com 10ml de GTA.

Os valores de PM apresentados referem-se à perda de massa em percentagem, determinados segundo a equação 4.1.

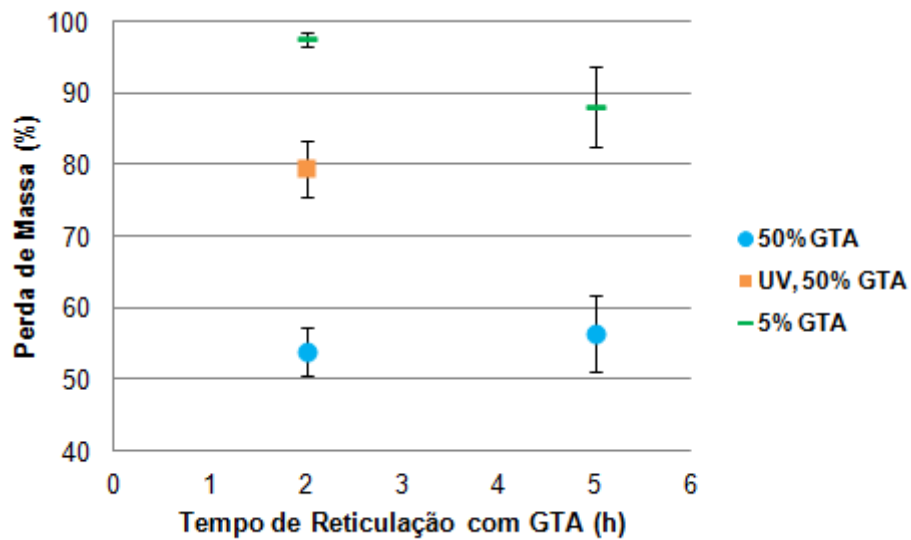
$$\%PM = \frac{m_{inicial} - m_{seca}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (4.1)$$

Os valores de perda de massa apresentados na Fig.4.11 são todos superiores a 50%, pelo que a reticulação nestas condições não é satisfatória. No entanto, a partir do mesmo gráfico, pode concluir-se que a perda de massa é inferior para a concentração de 50% de GTA relativamente à concentração de 5%. Esta observação pode ser explicada pelo facto da concentração de GTA, no ambiente a que estão expostas as matrizes, ser muito inferior na situação em que é utilizada a solução a 5%, o que diminui a probabilidade do estabelecimento de ligações do GTA com a gelatina. Por outro lado, a pré-exposição a radiação UV não evidenciou aumentar o grau de reticulação, sendo que a perda de massa do grupo de amostras sujeito ao pré-tratamento UV é superior em cerca de 25% à do grupo sujeito apenas à exposição a vapor de GTA nas mesmas condições. Desta forma, optou-se por não irradiar as amostras com UV e realizar a reticulação com vapor de GTA a 50%. Efectuaram-se ainda outras alterações no processo, nomeadamente, passou a usar-se um exsiccador com um vedante que garante a maior estanqueidade do volume onde se encontra o vapor de GTA e fixou-se a temperatura do processo para  $40^\circ\text{C}$ , com recurso a um forno (ver Fig.3.9). Assim, por forma a determinar o tempo de reticulação, consideraram-se então grupos de amostras sujeitos a diferentes tempos de exposição a vapor de GTA: 4, 6, 8, 10 e 12h. Os resultados de perda de massa destas amostras estão apresentados na Fig.4.12.

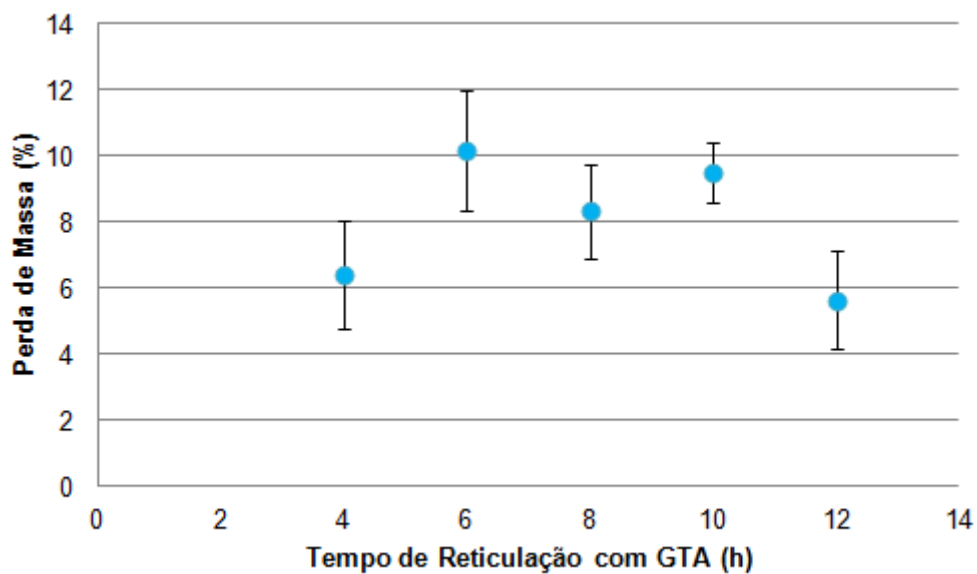


#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

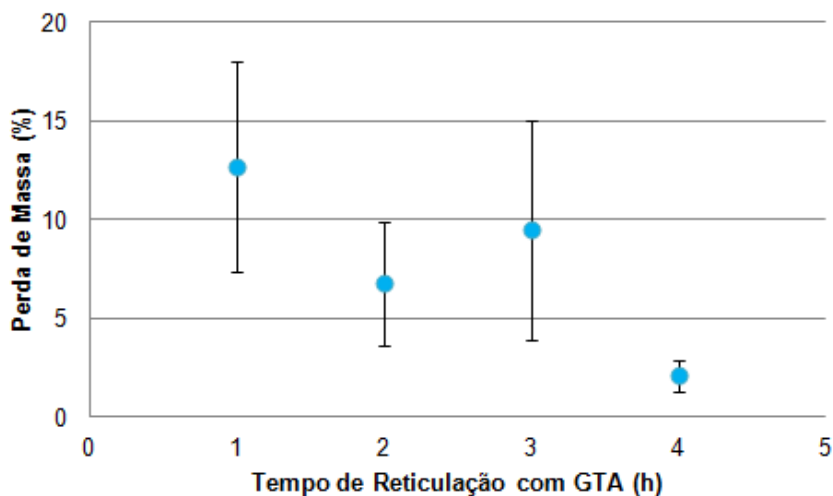
Uma vez que o valor da perda de massa das amostras de gelatina, ao fim de 4h de reticulação ( $6.4 \pm 1.6\%$ ), é aceitável, e por forma a averiguar se, para um tempo inferior a 4h, a reticulação da gelatina é desta ordem de grandeza, avaliou-se a perda de massa para 1, 2, 3 e 4h de exposição a vapor de GTA. Os resultados deste estudo apresentam-se na Fig.4.13.



**Figura 4.11:** Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com irradiação UV e/ou vapor de GTA (n=8)



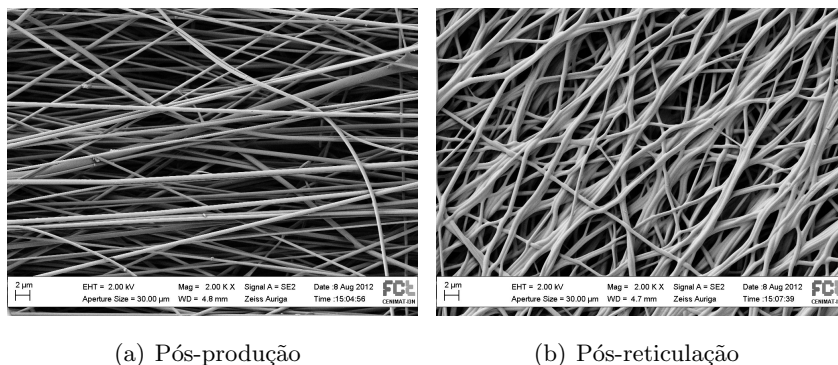
**Figura 4.12:** Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com vapor de GTA (n=5)



**Figura 4.13:** Perda de massa média de amostras de gelatina reticuladas com vapor de GTA (n=7)

A análise da Fig.4.13 permite confirmar que a reticulação das matrizes de gelatina com vapor de GTA a 50% durante 4h nas condições atrás referidas é eficaz. Além disso, após esse tempo de reticulação as amostras mantêm o aspecto original - tipicamente, as amostras têm tendência a encolher durante o processo de reticulação com GTA. Macroscopicamente, tempos de reticulação superiores a 8-10h parecem comprometer bastante a estrutura das matrizes.

Para avaliar a ocorrência da reticulação das fibras nos 5 tipos de matrizes foram também obtidas imagens de SEM das matrizes reticuladas e comparadas com as imagens de SEM das matrizes depois de produzidas. Nas Figs.4.14 a 4.18 constata-se que em todas as matrizes a reticulação resultou na fusão entre nanofibras. Isto é mais evidente nas Fig.4.14, Fig.4.15 e Fig.4.18. Nas duas primeiras, possivelmente devido à maior disponibilidade de grupos amina para estabelecer ligações com o grupo aldeído do GTA e na última, por existirem mais pontos de contacto entre as fibras, criados pela distribuição mais aleatória das mesmas, em relação às restantes matrizes de Gt/PCL.

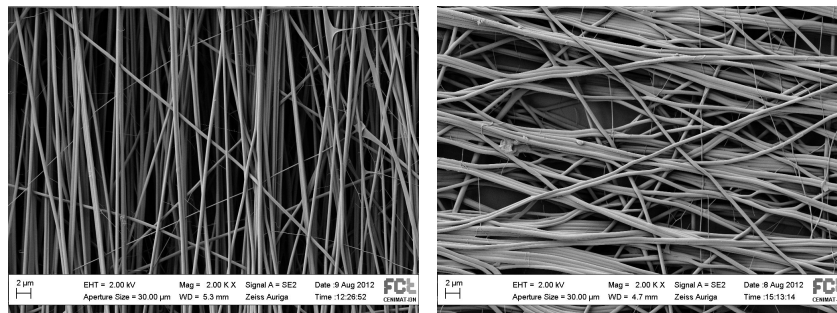


(a) Pós-produção

(b) Pós-reticulação

**Figura 4.14:** Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt-a. Ampliação: 2000x

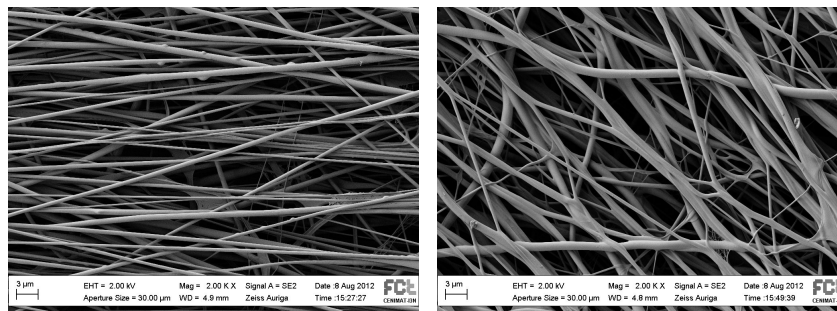
## CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



(a) Pós-produção

(b) Pós-reticulação

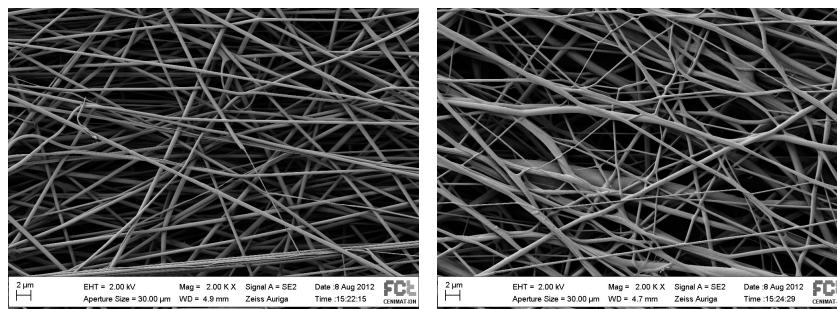
**Figura 4.15:** Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/CS-a. Ampliação: 2000x



(a) Pós-produção

(b) Pós-reticulação

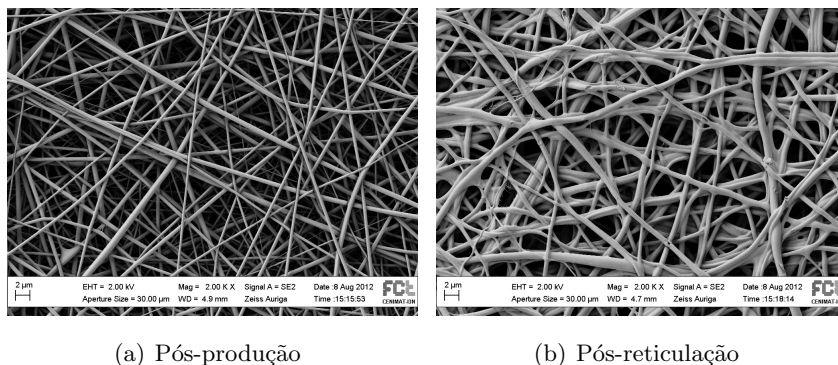
**Figura 4.16:** Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-a. Ampliação: 2000x



(a) Pós-produção

(b) Pós-reticulação

**Figura 4.17:** Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-s. Ampliação: 2000x



(a) Pós-produção

(b) Pós-reticulação

Figura 4.18: Avaliação do grau de reticulação das fibras de Gt/PCL-d. Ampliação: 2000x

## 4.3 Caracterização das matrizes

### 4.3.1 Análise morfológica das fibras após electrofiação

#### Diâmetros das fibras

Na Fig.4.19 apresentam-se os histogramas relativos à distribuição dos diâmetros das fibras para as diferentes matrizes em estudo e as imagens de SEM correspondentes. Na tabela 4.3 constam os valores de diâmetro médio ( $d_m$ ) obtidos, apresentando-se como incerteza o desvio padrão experimental.

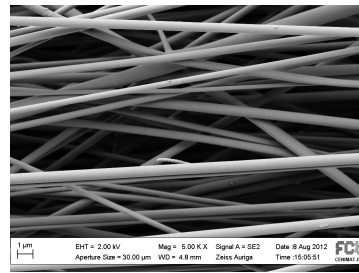
Tabela 4.3: Diâmetros médios das fibras dos 5 tipos de matrizes (n=30)

Matriz	$d_m$ (nm)
Gt-a	488±154
Gt/CS-a	427±108
Gt/PCL-a	425±166
Gt/PCL-s	444±136
Gt/PCL-d	467±186

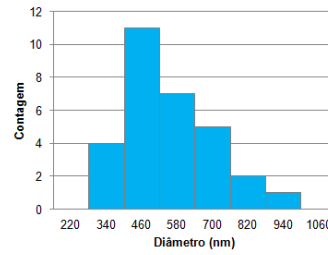
Por um lado, a análise das imagens de SEM permite confirmar que as matrizes obtidas por electrofiação são compostas por fibras sem contas. Por outro lado, pela análise dos valores apresentados na tabela 4.3, verifica-se que a diferença entre os diâmetros médios das fibras dos 5 tipos de matrizes é estatisticamente pouco significativa.

De uma forma geral, as matrizes de Gt e Gt/CS exibem fibras um pouco mais regulares do que as matrizes de Gt/PCL.

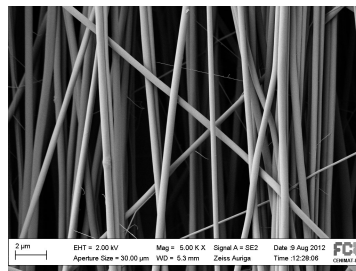
## CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



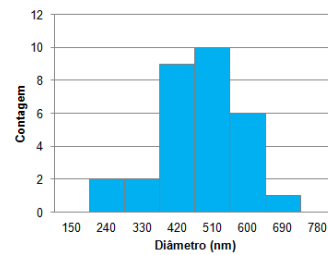
(a) Imagem de SEM de Gt-a



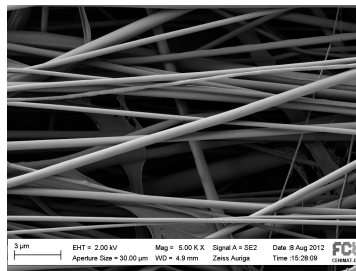
(b) Histograma de Gt-a



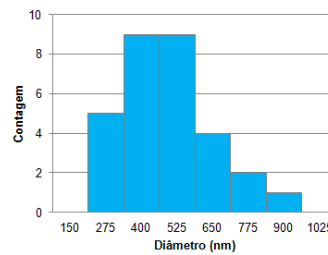
(c) Imagem de SEM de Gt/CS-a



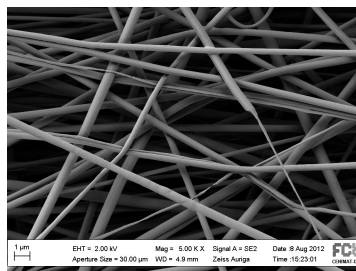
(d) Histograma de Gt/CS-a



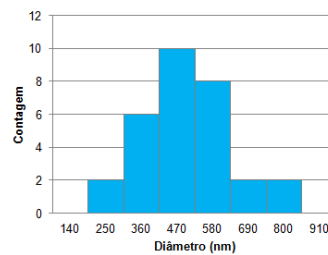
(e) Imagem de SEM de Gt/PCL-a



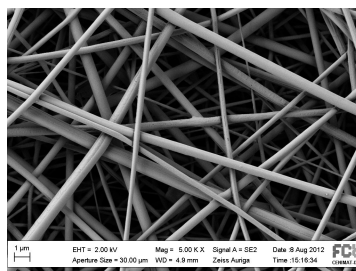
(f) Histograma de Gt/PCL-a



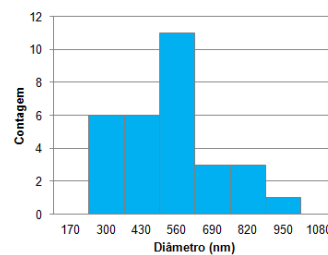
(g) Imagem de SEM de Gt/PCL-s



(h) Histograma de Gt/PCL-s



(i) Imagem de SEM de Gt/PCL-d



(j) Histograma de Gt/PCL-d

**Figura 4.19:** Distribuições dos diâmetros das fibras ( $n=30$ ) e respectivas imagens de SEM das matrizes. Ampliação: 5000x

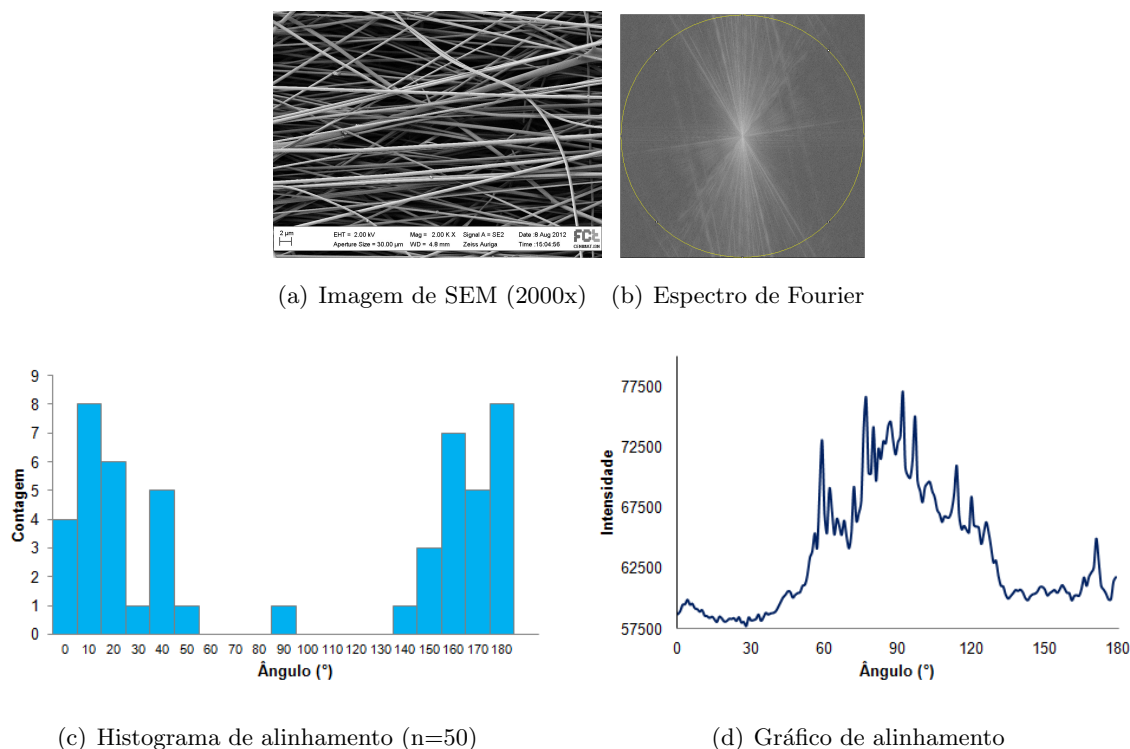
### Alinhamento das fibras

O estudo do grau de alinhamento das fibras dos vários tipos de matrizes em estudo (Gt, Gt/CS, Gt/PCLa, Gt/PCLs e Gt/PCLd) foi baseado na análise do gráfico de alinhamento obtido a partir do espectro de Fourier, das imagens de SEM, conforme apresentado no capítulo 3. Foi ainda analisada a distribuição angular das fibras nas matrizes das várias composições recolhidas à velocidade de rotação de 4000rpm. Todos estes elementos são apresentados nas Figs.4.20 a 4.24.

Conforme se pode observar nos gráficos de alinhamento das 3 matrizes obtidas com velocidade de rotação do colector cilíndrico de 4000rpm (fibras essencialmente alinhadas), surge sempre um pico definido para um determinado ângulo. A esta velocidade existe, pois, um ângulo de alinhamento preferencial.

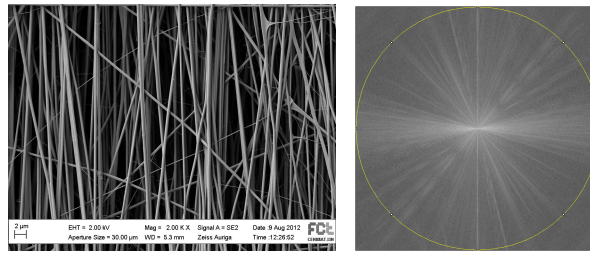
Contrariamente, nos gráficos de alinhamento relativos às fibras de Gt/PCL obtidas a velocidades de rotação do colector cilíndrico de 500rpm (desalinhadas) e 2000rpm (semialinhadas), não é possível identificar um ângulo de alinhamento preferencial.

Confrontando as Figs.4.23 e 4.24, verifica-se que a diferença entre o grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL desalinhadas e semialinhadas é notória. O gráfico de alinhamento das fibras de Gt/PCL desalinhadas apresenta intensidades, em torno de um mesmo valor para todos os ângulos, o que também é evidenciado no espectro de Fourier. O gráfico de alinhamento das fibras de Gt/PCL semialinhadas apresenta uma distribuição de intensidades que, embora seja larga, exhibe uma região de máximo.

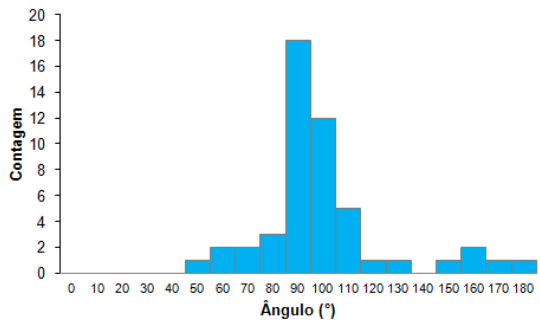


**Figura 4.20:** Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt-a

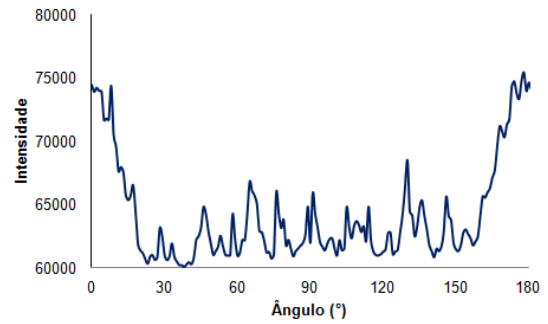
CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



(a) Imagem de SEM (2000x) (b) Espectro de Fourier

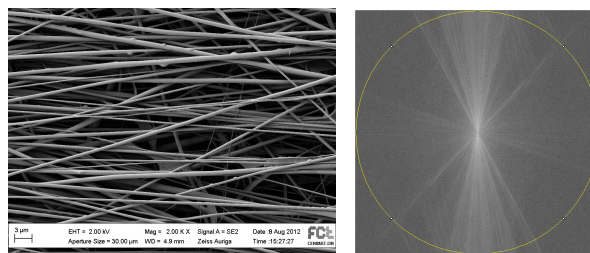


(c) Histograma de alinhamento (n=50)

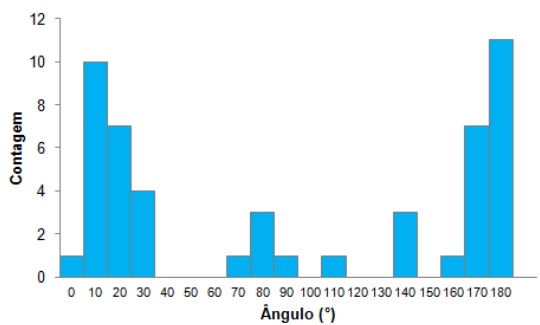


(d) Gráfico de alinhamento

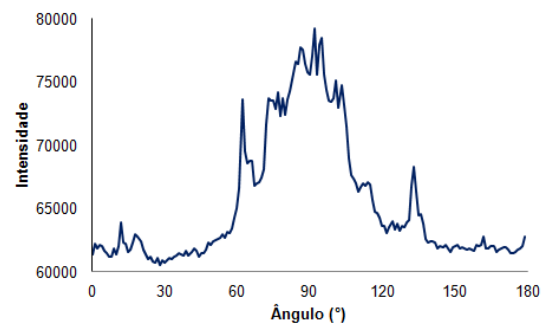
Figura 4.21: Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/CS-a



(a) Imagem de SEM (2000x) (b) Espectro de Fourier



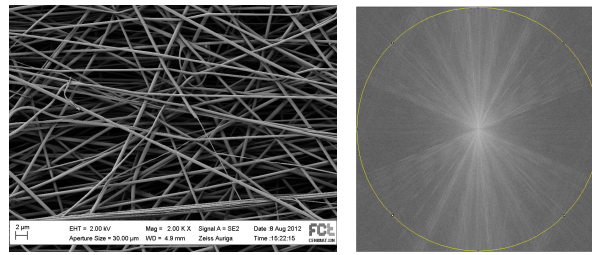
(c) Histograma de alinhamento (n=50)



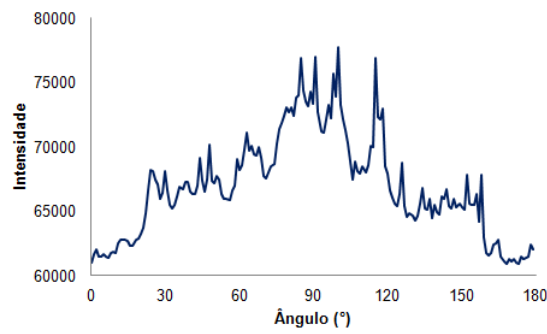
(d) Gráfico de alinhamento

Figura 4.22: Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-a

CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

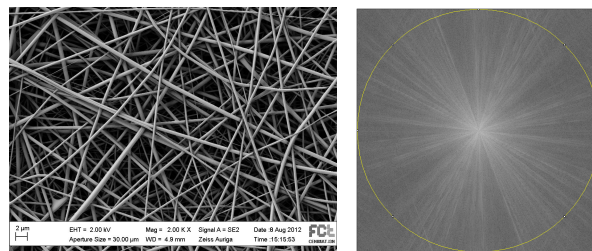


(a) Imagem de SEM (2000x) (b) Espectro de Fourier

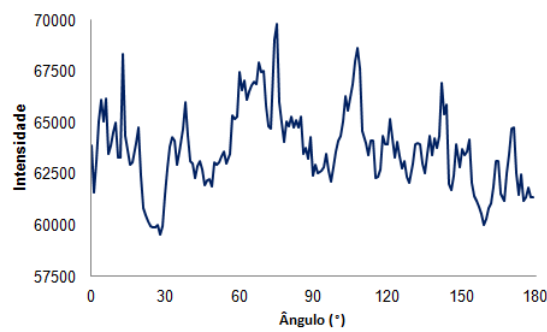


(c) Gráfico de alinhamento

Figura 4.23: Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-s



(a) Imagem de SEM (2000x) (b) Espectro de Fourier



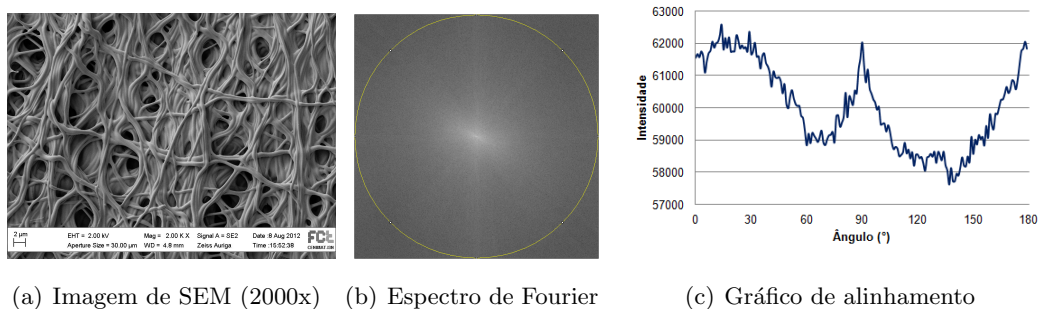
(c) Gráfico de alinhamento

Figura 4.24: Avaliação do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-d

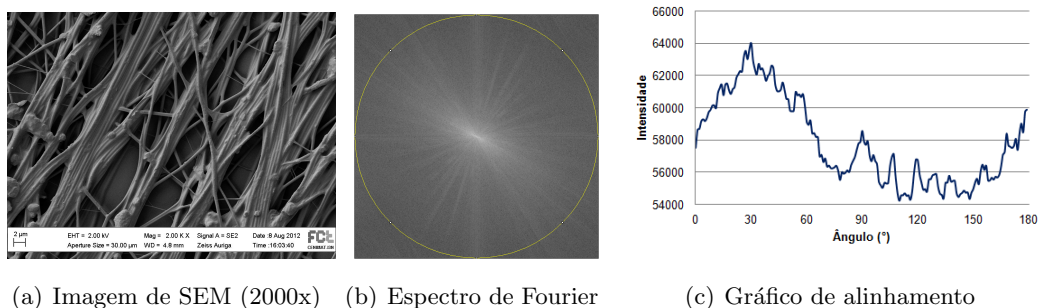


### 4.3.2 Análise morfológica das matrizes reticuladas após lavagem

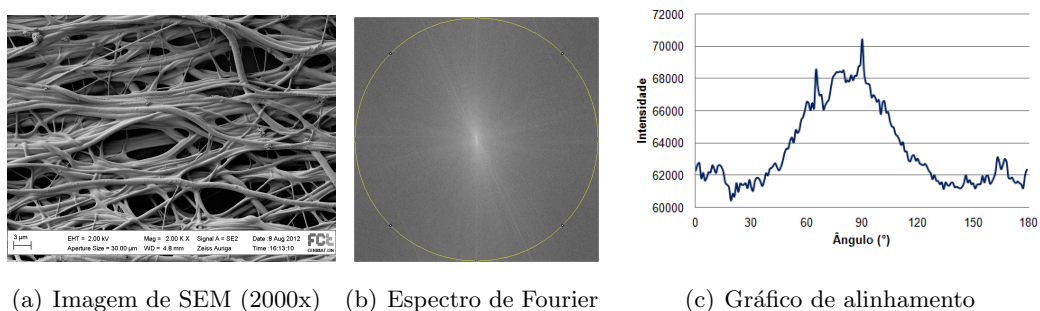
Na cultura celular são utilizados diversos meios aquosos, os quais têm influência na estrutura das matrizes. Deste modo, as matrizes foram caracterizadas morfológicamente após lavagem com água destilada.



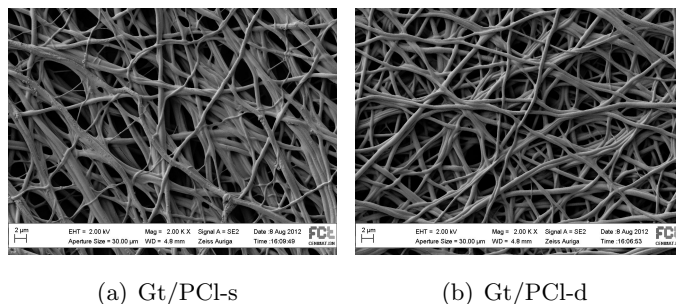
**Figura 4.25:** Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt-a pós-lavagem



**Figura 4.26:** Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt/CS-a pós-lavagem



**Figura 4.27:** Análise do grau de alinhamento das fibras de Gt/PCL-a pós-lavagem



**Figura 4.28:** Imagens de SEM de matrizes de Gt/PCL-s e Gt/PCL-d pós-lavagem. Ampliação: 2000x

As imagens de SEM dos 5 tipos de matrizes evidenciam fusão entre fibras, resultante de alguma dissolução do polímero, mais visível nas Figs.4.25 e 4.28. Apesar desta fusão, a topografia das matrizes lavadas continua a exibir relevo com direcções preferenciais, como mostram os espectros de Fourier e os gráficos de alinhamento destas matrizes (ver Figs.4.25 a 4.27).

### 4.3.3 Análise química por FTIR

A análise de FTIR teve como objectivos identificar nas matrizes os grupos funcionais característicos dos polímeros utilizados, e determinar alterações químicas decorrentes da formação de ligações, em particular as correspondentes a reticulação (entre a gelatina ou o quitosano, e o GTA). Nas tabelas 4.4 a 4.6 encontram-se listados os modos de vibração identificados na literatura para a gelatina, o quitosano e o PCL, respectivamente.

**Tabela 4.4:** Modos de vibração FTIR identificados para a gelatina

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo Funcional	Referência
3300	Estiramento N-H (amida A)	[63] [68]
3032	Estiramento C-H	[83]
1636-1660	Estiramento C=O (amida I)	[60] [63] [84] [68]
1540-1544	Deformação angular N-H e estiramento C-N (amida II)	[60] [63]
1240-1245	Deformação angular N-H (amida III)	[63] [84] [68]
629	Amida V, torção C-N e flexão N-H	[36]

CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

**Tabela 4.5:** Modos de vibração FTIR identificados para o quitosano

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo Funcional	Referência
3100-3500	Estiramento N-H e OH...O	[85]
2800-2900	Estiramento $\text{CH}_2$	[86]
1654	Amida I	[87]
1598	Amida II (amina primária - $\text{NH}_2$ )	[86]
1425	Flexão do grupo $\text{CH}_2$	[87]
1380	Flexão C-H e deformação C- $\text{CH}_3$	[87]
1155-1032	Estrutura do polissacárido	[87]

**Tabela 4.6:** Modos de vibração FTIR identificados para o PCL

Comprimento onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Grupo Funcional	Referência
2949	Estiramento assimétrico $\text{CH}_2$	[60] [88]
2865	Estiramento simétrico $\text{CH}_2$	[60] [88]
1727	Estiramento C=O	[60] [88]
1293	Estiramento C-O e C-C (fase cristalina)	[60] [88]
1240	Estiramento assimétrico C-O-C	[60] [88]
1157	Estiramento C-O e C-C (fase amorfa)	[88]

Nas Figs.4.29 a 4.33 apresentam-se, em modo de absorvância, os espectros de FTIR obtidos. Com as Figs.4.29 a 4.31 pretende-se ilustrar as diferenças entre os espectros das amostras após a produção e após reticulação. Com a Fig.4.33 pretende-se inferir acerca das possíveis interações moleculares entre os polímeros.

Nos espectros de FTIR das matrizes de gelatina (ver Fig.4.29) tanto na condição de pós-produção (Gt) como na de pós-reticulação (Gt-Ret), é possível identificar os grupos funcionais. No espectro da matriz de Gt reticulada identifica-se ainda um pico de maior intensidade relativa, a  $1448\text{cm}^{-1}$ , característico da absorção do grupo aldimina ( $\text{CH}=\text{N}$ ), resultante das ligações estabelecidas durante o processo de reticulação [68].

Os espectros de FTIR de filmes de quitosano pós-produção (CS) e pós-reticulação (CS-Ret) permitem identificar os grupos característicos deste polímero. Porém, a análise dos espectros não permite concluir acerca da ocorrência da reticulação.

No espectro de FTIR das matrizes de Gt/CS identificam-se as bandas correspondentes aos dois polímeros. No espectro da matriz reticulada (Gt/CS-Ret) a intensidade relativa dos picos relativos às amidas I e II, bem como a intensidade do pico amida II relativamente ao pico amida I reduz-se, o que pode indiciar a formação de ligações entre o CS e a Gt mediadas pelo GTA para além da reticulação entre cadeias do mesmo polímero.

No espectro do filme de PCL (ver Fig.4.32) destacam-se os picos do estiramento do grupo carbonilo (C=O), a  $1721\text{cm}^{-1}$ , e do estiramento assimétrico da ligação glicosídica (C-O-C), a  $1238\text{cm}^{-1}$ . Também estão presentes os picos a  $2944\text{cm}^{-1}$  e  $2865\text{cm}^{-1}$ , característicos

#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

das vibrações assimétricas (as) e simétricas (s) do estiramento do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ), respectivamente, e os picos característicos da fase cristalina e da fase amorfa do PCL, a  $1293\text{cm}^{-1}$  e a  $1160\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

Por sua vez, no espectro da matriz de Gt/PCL (ver Fig.4.33) são distinguíveis os picos de ambos os polímeros. A partir do espectro não é possível concluir acerca de interações intermoleculares entre os dois polímeros, o que sugere a manutenção das respectivas identidades funcionais dos mesmos na matriz.

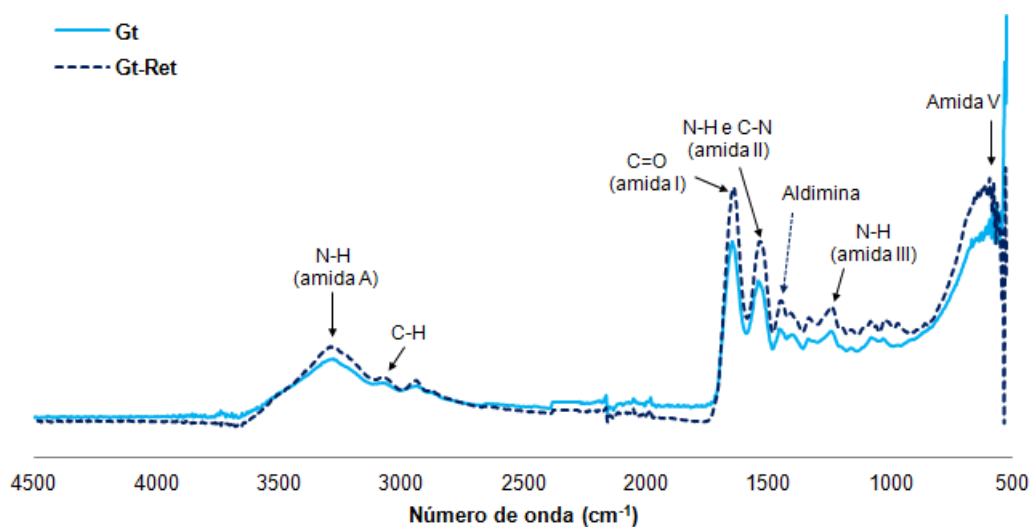


Figura 4.29: Espectros de FTIR de amostras de Gt pós-produção e pós-reticulação

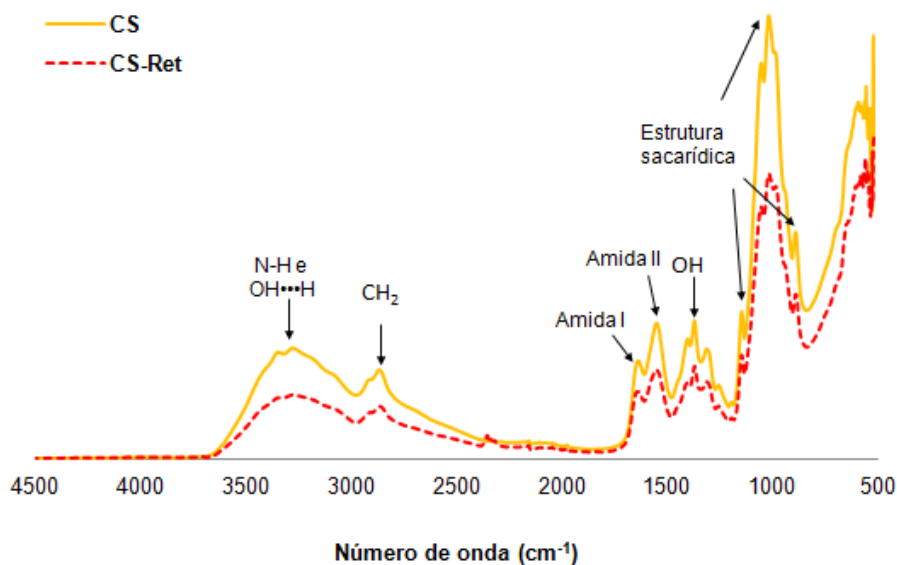


Figura 4.30: Espectros de FTIR de amostras de CS pós-produção e pós-reticulação

CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

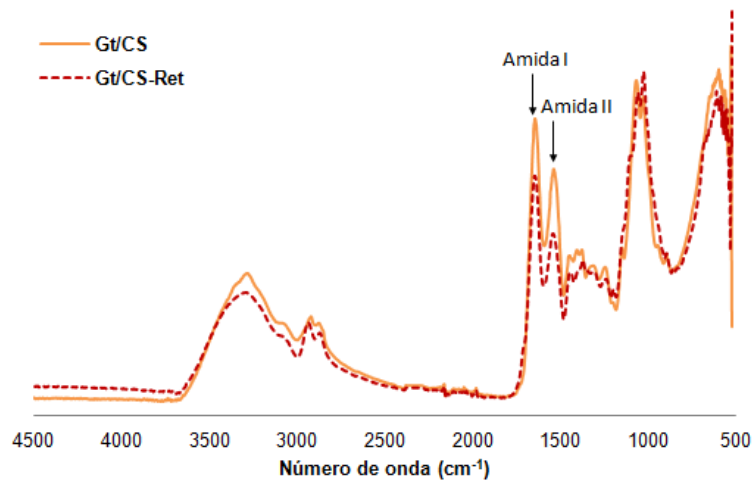


Figura 4.31: Espectros de FTIR de amostras de Gt/CS pós-produção e pós-reticulação

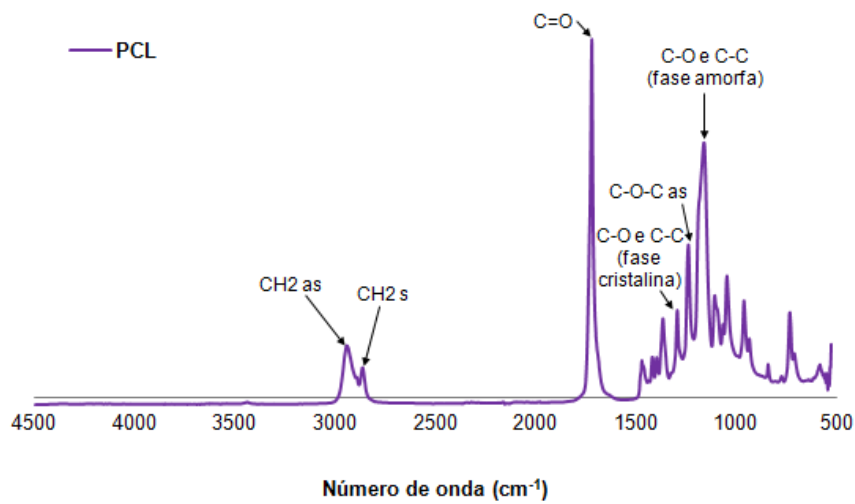


Figura 4.32: Espectro de FTIR de uma amostra de PCL pós-produção

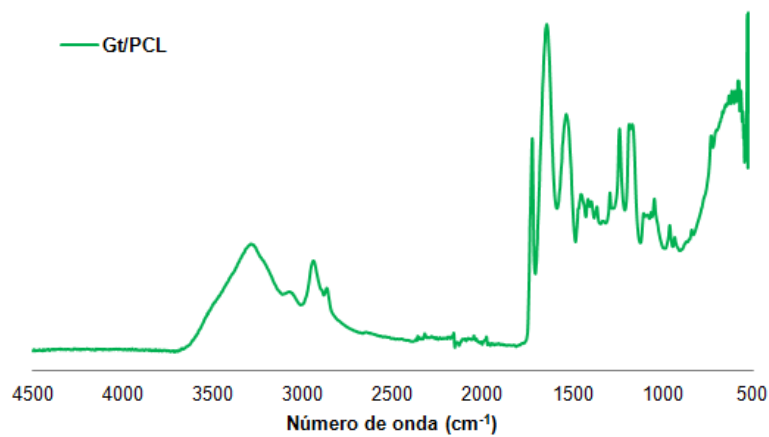


Figura 4.33: Espectros de FTIR de amostras de Gt/PCL pós-produção

## 4.4 Cultura celular

As culturas celulares começaram por seguir os procedimentos básicos de cultura celular numa placa de poços, mas incluindo matrizes depositadas nas lamelas no fundo dos mesmos. Utilizaram-se 3 réplicas de cada tipo de matriz em estudo e 3 lamelas onde seriam semeadas células para controlo e posterior observação no microscópio de fluorescência. Procedeu-se à esterilização das matrizes (ver Apêndice A.1). Seguidamente, procedeu-se à contagem das células N1E-115 (ver Apêndice A.2), semeadas na FCM num frasco T25 (com fundo tratado para células aderentes), e que se encontravam a cerca de 80% de confluência. Numa placa de 48 poços semearam-se aproximadamente 30000 células por poço, nas matrizes e nos controlos, colocando 500 $\mu$ l de meio de crescimento.

Os controlos foram observados diariamente no microscópio óptico invertido com contraste de fase (as matrizes não possibilitam observação da morfologia celular). Ao fim de 4 dias, o meio foi mudado para meio de diferenciação, pois o crescimento das células antes dessa altura era insuficiente. As células N1E-115 são consideradas semiaderentes, o que poderá justificar a fraca adesão celular das células semeadas e esta observação. O aspecto geral da morfologia das células do controlo era heterogéneo, visualizando-se algumas delas já com prolongamentos. Os poços de controlo também exibiam diferenças entre si.

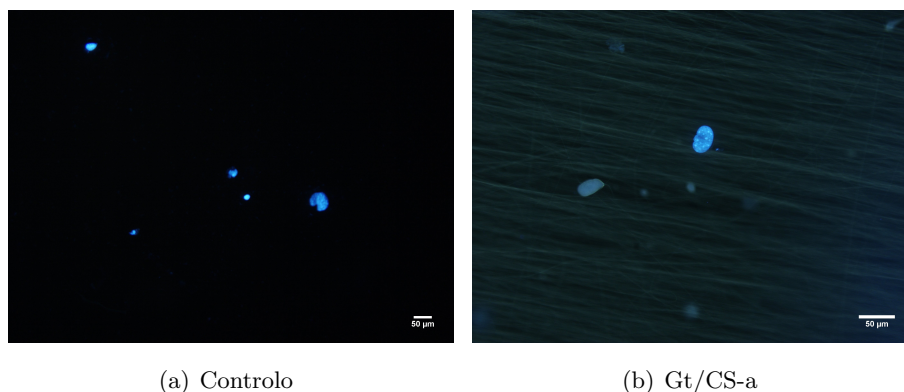
Após 4 dias em meio, realizou-se a fixação e marcação dos núcleos das células, seguindo um protocolo típico (ver Apêndice A.4). É de referir que, em diversos momentos, durante os procedimentos referentes à sementeira, à mudança de meio e à marcação nuclear, as matrizes se soltaram das lamelas e algumas enrolaram-se sobre si mesmas. Desta forma, apenas foi possível fixar e marcar as células cultivadas em algumas matrizes. Na Fig.4.34 apresentam-se imagens do microscópio de fluorescência representativas do conjunto de amostras observado. Verifica-se que, na totalidade das observações, existem poucos núcleos que se apresentam redondos.

Perante as observações durante esta primeira experiência, decidiu-se alterar a condição do controlo da experiência e avaliar a viabilidade celular com PrestoBlue® antes da fixação e marcação celular. Por forma a observar-se a marcação do citoesqueleto com faloidina vermelha procedeu-se à redução da autofluorescência no vermelho associada à reticulação com GTA<sup>2</sup>, usando uma solução de boro-hidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>) a 0.1% em PBS. Desta forma, utilizaram-se dois tipos de controlos (positivos). Num deles as células foram semeadas sobre lamelas, tratadas com uma solução de gelatina a 0.1% em água (controlo-1), prevendo-se assim melhor aderência das células ao substrato. No outro controlo semearam-se as células directamente nos poços com fundo tratado para células aderentes (controlo-2). Este último constitui situação habitual de sementeira recomendada para as células N1E-115. Numa placa de 48 poços colocaram-se 4 réplicas de cada tipo de matriz e de cada controlo e seguiu-se o protocolo de esterilização das matrizes (ver Apêndice A.1). Relativamente ao controlo-1, que

---

<sup>2</sup>Esta fluorescência deve-se à formação de bases de Schiff resultantes da reacção do grupo aldeído com o grupo amina durante a reticulação com GTA.

corresponde a lamelas cobertas com gelatina, foi seguido o protocolo de esterilização e, após o passo 3, foram pipetados  $300\mu\text{l}$  de gelatina. Seguiu-se o passo 4, deixando-se em simultâneo a gelatina nas lamelas durante 45min e retirou-se, de seguida, o excesso. Quanto à densidade celular e quantidade de meio de crescimento em cada poço procedeu-se à semelhança da experiência anterior.



**Figura 4.34:** Imagens de MF de marcação com DAPI de células N1E-115 ao 4º dia em meio de diferenciação

A alteração do meio (de crescimento) para meio de diferenciação foi efectuada ao fim de 3 dias e ao 4º dia de diferenciação foi realizado o teste de viabilidade com o reagente PrestoBlue® (ver Apêndice A.3). O reagente foi adicionado a 3 réplicas de cada situação e em meio de diferenciação, pipetado para 4 poços, 2 dias antes, aquando da mudança de meio, por forma a serem asseguradas condições semelhantes para todas as leituras de absorvância necessárias. Aos valores de absorvância lidos foi subtraído o valor de absorvância do meio, por forma a fazer uma determinação da viabilidade celular relativa. Na Fig.4.35 apresentam-se os resultados deste teste. Estes correspondem apenas à média dos valores de absorvância do meio com células dos poços em que as matrizes se mantiveram nas lamelas. Em geral, estes resultados revelam que a viabilidade das células cultivadas nas matrizes é superior relativamente a ambos os controlos.

No 5º dia de diferenciação, seguiu-se o protocolo de fixação e marcação (ver Apêndice A.4) com a adição de  $500\mu\text{l}$  de boro-hidreto de sódio a cada poço com matriz, antes do último passo (marcação com DAPI). Após aproximadamente 5min, efectuaram-se 3 lavagens com PBS. A reacção provocou o aparecimento de algumas bolhas.

Na observação das marcações nucleares das células, apenas o controlo-1 do poço D6 (não sujeito ao teste com PrestoBlue®) apresentou uma densidade de núcleos considerável (ver Fig. 4.36(a)). As restantes amostras, quer das células controlo quer das células cultivadas nas matrizes apresentam poucos núcleos, conforme ilustram as Figs.4.36(b) e 4.36(c).

A possível existência de grupos aldeídos do GTA não reagidos durante o processo de reticulação das matrizes, poderia explicar alguma toxicidade das matrizes. Contudo, os resultados do PrestoBlue® correspondentes ao 4º dia de cultura não indiciam toxicidade das

CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

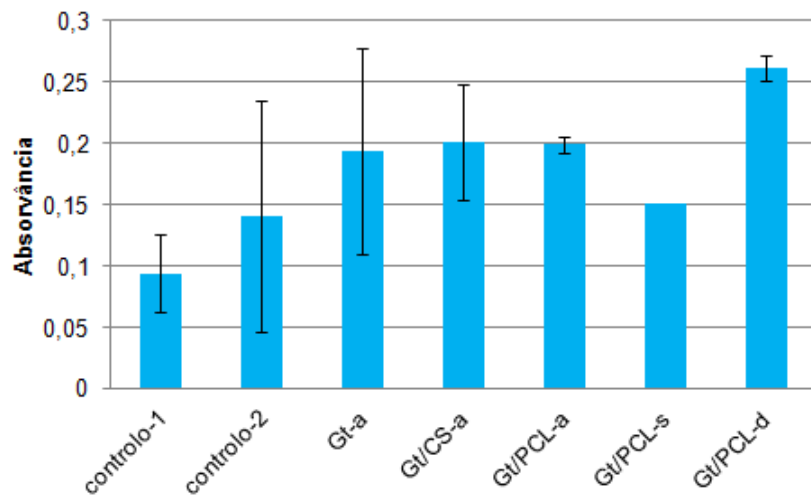


Figura 4.35: Absorbância - Teste de viabilidade celular com o reagente PrestoBlue®

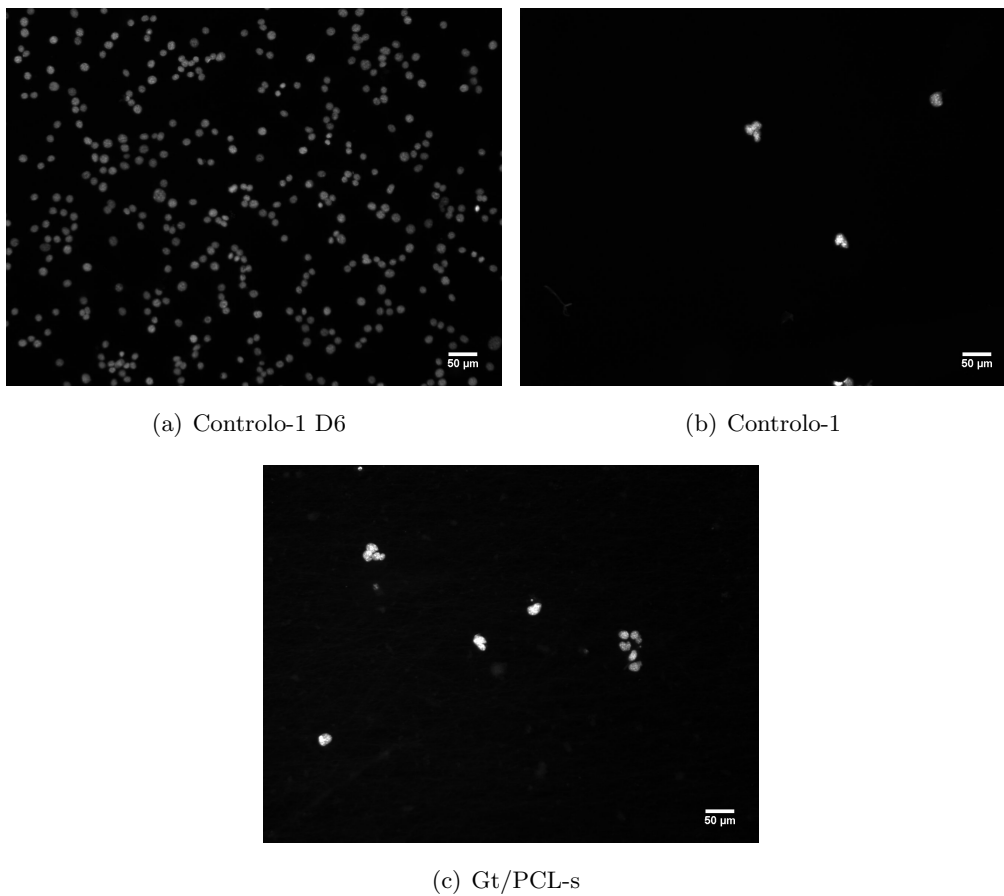


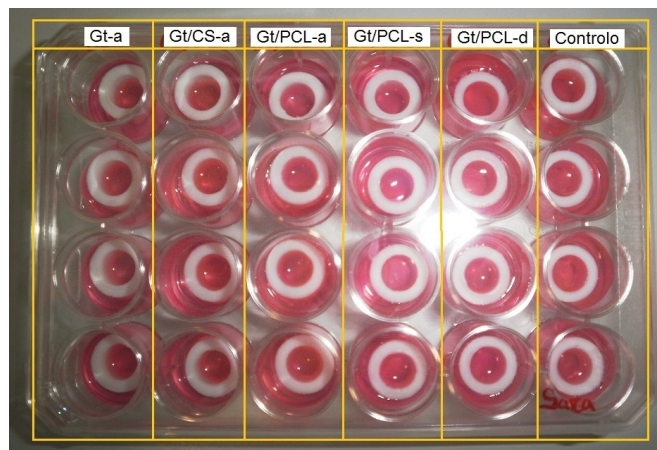
Figura 4.36: Imagens de MF de marcação com DAPI de células N1E-115 ao 5º dia em meio de diferenciação



## CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

matrizes. No entanto, estes valores também devem ser analisados com alguma precaução já que, devido a algumas matrizes se soltarem das lamelas, os resultados dos poços com as matrizes correspondem parcialmente a células que aderiram ao fundo do poço e estiveram assim apenas em contacto indirecto com as matrizes. Também se levanta a hipótese de algo ter ocorrido entre o 4º e o 5º dia de cultura ou algum dos reagentes utilizados, nomeadamente, o PrestoBlue® ou o boro-hidreto de sódio potenciar algum efeito negativo nas células.

Claramente o facto das matrizes se soltarem das lamelas constitui um entrave ao estudo em questão. Por isso, contornou-se este problema colocando anilhas de teflon sobre as matrizes (ver Fig.4.37). O teflon apresenta uma muito baixa reactividade e espera-se, por isso, que não seja tóxico. Esta abordagem implica que vários passos do estudo sejam ajustados. Em primeiro lugar, as anilhas não encaixam nos poços de uma placa de 48 poços, pelo que se usou uma placa de 24 poços. Assim, a quantidade de meio a pipetar em cada poço teve de ser ajustada. Entre a matriz e a anilha há alguma difusão de meio e portanto, por forma a assegurar que a quantidade de meio era suficiente para as células, pipetou-se meio no interior e exterior das anilhas. Usou-se 750µl de meio nos poços e 500µl nas lavagens.

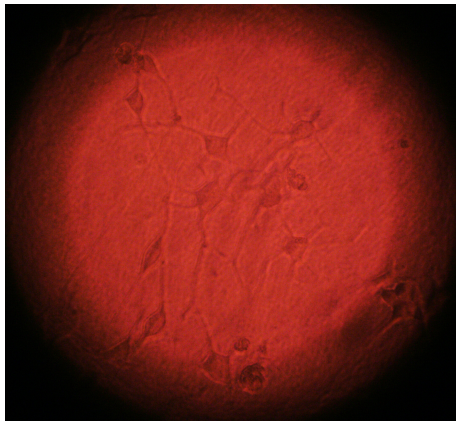


**Figura 4.37:** Placa de 24 poços da cultura celular com anilhas de teflon

Com a inserção da anilha, a área de sementeira nas matrizes (a efectuar apenas dentro da anilha) fica reduzida em cerca de 2 vezes, o que naturalmente implica que o número de células a semear seja reduzido a cerca de metade, em relação às duas experiências anteriores para se ter a mesma densidade celular. No entanto nesta experiência acabou por ser semeada uma densidade celular consideravelmente inferior à das experiências anteriores. A ordem dos passos do protocolo de esterilização foi alterada, por forma a haver esterilização de toda a superfície das matrizes previamente à colocação das anilhas. Por outro lado, visando assegurar a não toxicidade devida a grupos aldeídos do GTA que eventualmente não tivessem reagido durante o processo de reticulação das matrizes, substituiu-se a segunda lavagem com PBS do protocolo de esterilização pela imersão em meio (de crescimento) durante cerca de 5min. Este passo surge da hipótese de alguns constituintes do meio estabelecerem porventura ligações com os grupos aldeído do GTA livres.

## CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Nesta experiência apenas se estabeleceu como controlo células semeadas nas lamelas cobertas com gelatina a 0.1%. A alteração do meio de crescimento para meio de diferenciação foi realizada 2 dias depois da sementeira, pois as células aderiram e cresceram bem (nos poços controlo). No microscópio óptico invertido com contraste de fase, observou-se, nos controlos, a diferenciação celular, relativamente sincronizada, acompanhando-se assim o crescimento dos prolongamentos ao longo do tempo. A Fig.4.38, fotografia representativa das observações no microscópio óptico, evidencia a morfologia das células N1E-115 em diferenciação.



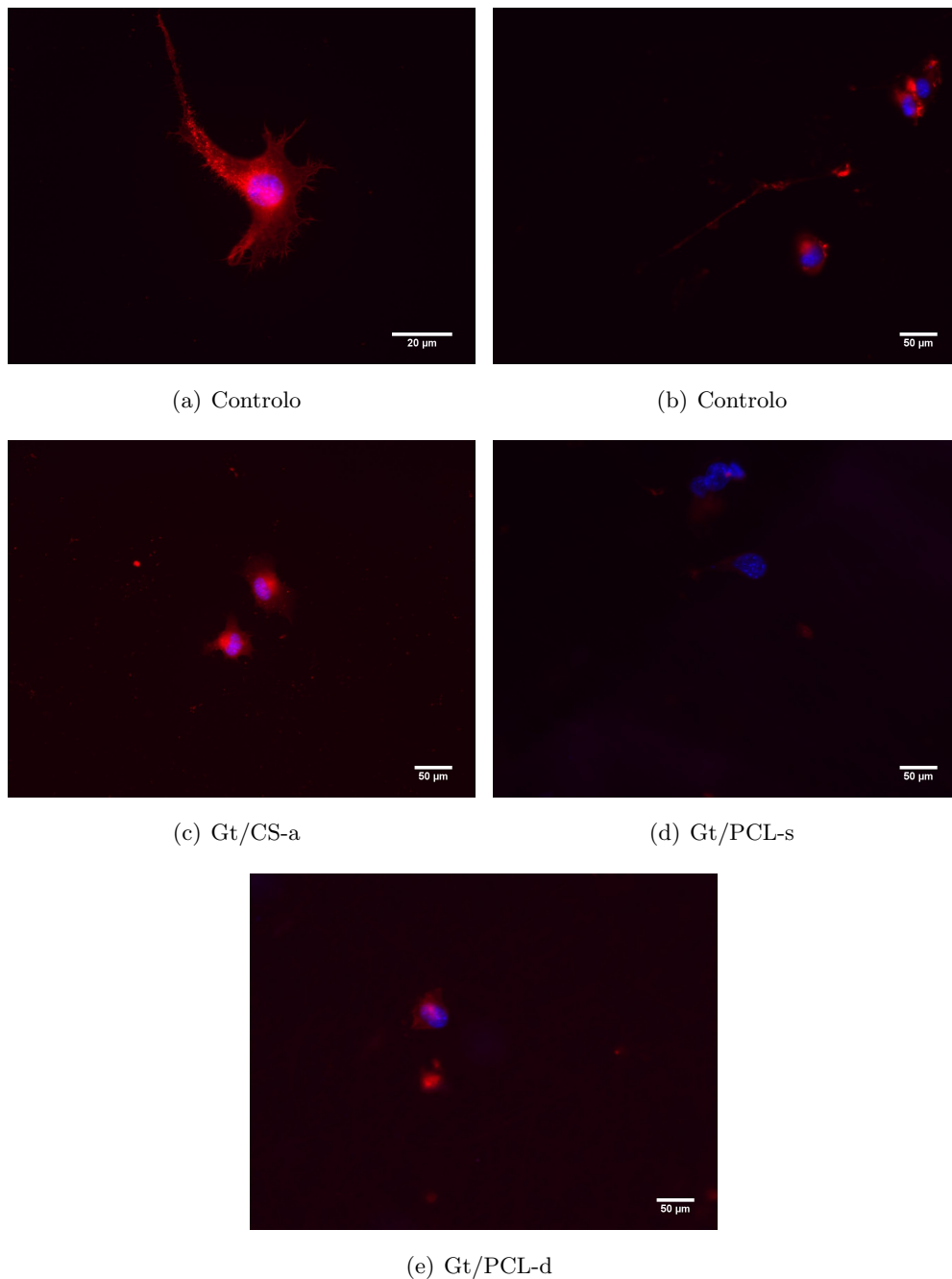
**Figura 4.38:** Células N1E-115 ao 4º dia em meio de diferenciação (controlo do poço C6)

Foram efectuados os procedimentos para a realização do teste de viabilidade celular com o reagente PrestoBlue® (ver Apêndice A.3). A mistura do reagente no meio não foi homogênea, devido a ocorrer difusão do interior para o exterior da anilha e portanto os resultados não são credíveis. Os poços da fila D da placa de 24 poços não foram sujeitos a este teste. De seguida procedeu-se à fixação e dupla marcação com DAPI e faloidina. Após o tratamento das matrizes com o boro-hidreto de sódio para redução do nível de fluorescência devida à reticulação com GTA, efectuou-se a marcação nuclear com DAPI nos poços da fila D (30µl para cada amostra). As células foram depois marcadas com faloidina-A568 em PBS, na proporção de 1:100, durante 1h à temperatura ambiente. As amostras foram colocadas sobre gotas de 30µl de faloidina, por cima de Parafilme, o qual foi colocado por cima de papel absorvente previamente humedecido, dentro de uma caixa. Durante todos os procedimentos foram mantidas as anilhas, que só foram retiradas no último passo, para observação ao microscópio de fluorescência. Observaram-se algumas células viáveis, mas poucas células com organização do citoesqueleto com prolongamentos típicos, conforme ilustra a Fig.4.39. Na Fig.4.39(a) observa-se com nitidez uma célula diferenciada de um poço de controlo. Mantiveram-se mais 6 amostras, que tinham sido sujeitas ao reagente PrestoBlue®, em faloidina a 4°C, *overnight*, e as observações de fluorescência foram semelhantes às anteriores. Enquanto que se observaram várias células com prolongamentos extensos nos controlos no microscópio óptico com contraste de fase (ver Fig.4.38), nas observações de fluorescência das marcações duplas, observaram-se poucas células e praticamente sem protrusões (ver Fig.4.39). Assim, não se

#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

verificou haver uma correspondência entre estas observações. Quando foi adicionado o boro-hidreto de sódio as matrizes ficaram com muitas bolhas e soltaram-se. Por outro lado, a redução do GTA não foi totalmente eficaz no que diz respeito à fluorescência observada nas matrizes.

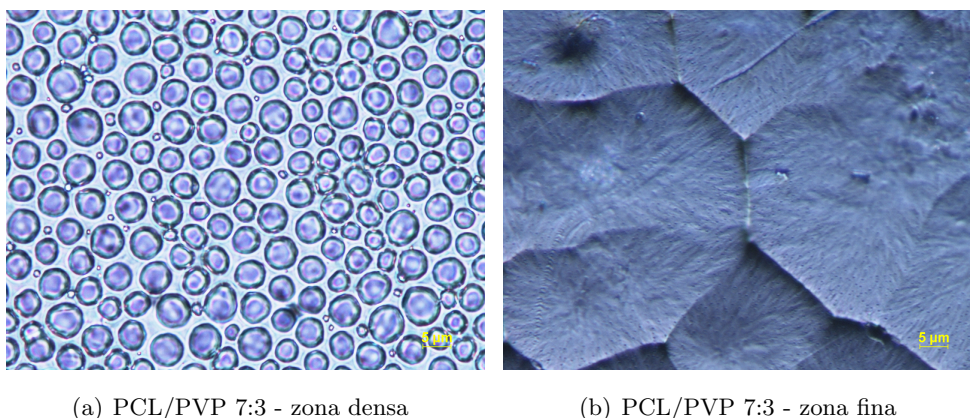
Nas várias experiências realizadas, desenhou-se um protocolo geral de cultura das células N1E-115 nas matrizes, mas este ainda precisa de ser melhorado.



**Figura 4.39:** Imagens de MF de marcação com DAPI e faloidina de células N1E-115 ao 5º dia em meio de diferenciação

## 4.5 Produção e caracterização de filmes porosos

A partir das soluções poliméricas de PCL e PEO, PEG ou PVP, na proporção de 7:3 e numa concentração polimérica total de 1g/dl em diclorometano, foram obtidos filmes finos de PCL. Macroscopicamente, a generalidade dos filmes obtidos apresentam espessura não uniforme e bastante reduzida, na ordem das dezenas de  $\mu\text{m}$ . Microscopicamente, observaram-se zonas distintas no que diz respeito à distribuição de poros e à espessura do filme, conforme se observa na Fig.4.40. Na zona densa são visíveis as consequências da formação de domínios do PVP, o que não se observa na zona fina. Nas imagens de MO identificaram-se várias estruturas circulares distribuídas, mas nem todas aparentavam ser poros totalmente abertos.



(a) PCL/PVP 7:3 - zona densa

(b) PCL/PVP 7:3 - zona fina

**Figura 4.40:** Imagens de MO de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PVP com agitação magnética. Ampliação: 100x

Estudaram-se outras proporções poliméricas e a concentração polimérica total foi reduzida para 0.4g/dl, visando obter poros abertos a partir de filmes mais finos. Com o intuito de garantir a homogeneidade das soluções e consequentemente uma separação de fases mais uniforme, recorreu-se à agitação ultrassónica de algumas soluções após agitação magnética, conforme consta na tabela 4.7. Prepararam-se soluções de PCL em diclorometano e soluções dos outros polímeros em diclorometano, conforme as proporções dos polímeros nas soluções finais e todas elas foram colocadas em agitação magnética. Após total dissolução, misturaram-se as soluções para obter a concentração pretendida usando o tipo de agitação destinado.

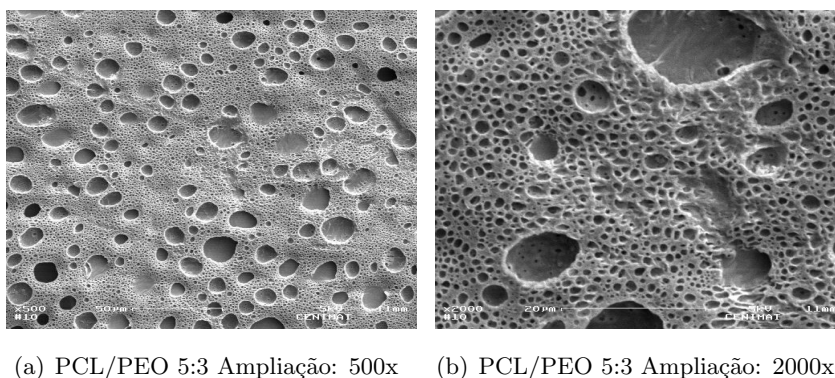
**Tabela 4.7:** Condições da preparação das soluções de PCL/PEO, PCL/PEG e PCL/PVP

Proporção de PCL/polímero	Tipo de agitação da solução polimérica
5:3	Magnética
5:5	Magnética
7:3	Magnética ou Ultrassónica
3:7	Magnética ou Ultrassónica
9:1	Magnética ou Ultrassónica

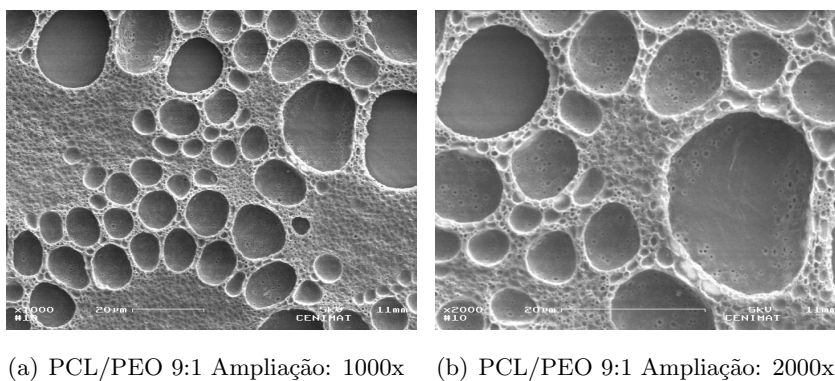
#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

As imagens de SEM dos filmes seleccionados, com base nas observações ao MO, tendo em conta a existência de poros aparentemente abertos, apresentam-se nas Figs.4.41 a 4.44. Pela observação das Fig.4.41 e 4.42, verifica-se que nos filmes de PCL/PEO de ambas as proporções dos polímeros e com diferentes tipos de agitação das misturas, os poros apresentam tamanhos distintos entre si e uma distribuição pouco uniforme dos mesmos. Além disso, identificam-se poucos poros abertos (estruturas mais escuras).

As Figs.4.44(a) e 4.44(d) demonstram a influência das proporções de polímeros utilizadas nas soluções no filme obtido. Enquanto que a partir da solução de PCL/PEG em que a quantidade de PCL é bastante superior à de PEG (9:1) se obtém, pós-lavagem do PEG, um filme com um padrão de estruturas de forma alongada e disperso, a partir da solução de 3:7, obtém-se um filme com distribuição de poros de forma circular mais uniforme. No entanto, a Fig.4.44 revela que existem mais estruturas abertas nos filmes de PCL/PEG de 9:1 do que nos de 3:7. Pela observação da Fig.4.43, verifica-se que o filme de PCL/PVP de 9:1 possui uma estrutura não homogênea de poros no que diz respeito quer à forma quer ao tamanho.

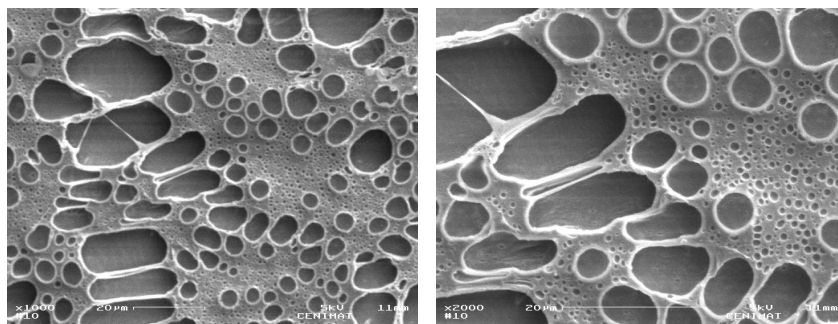


**Figura 4.41:** Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEO com agitação magnética



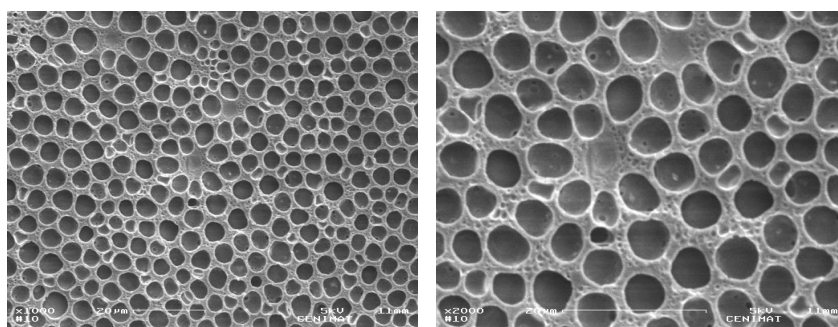
**Figura 4.42:** Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEO com agitação ultrassônica

#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

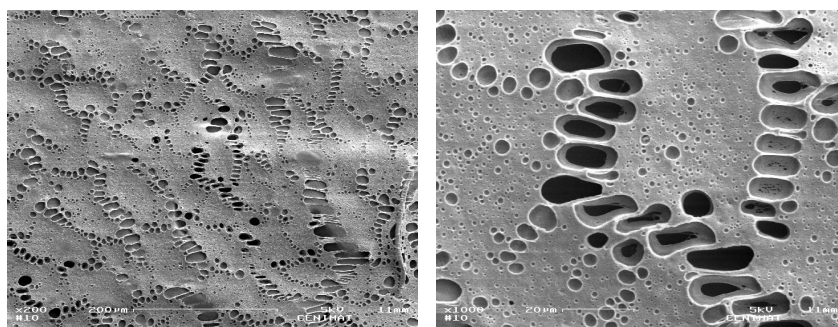


(a) PCL/PVP 9:1 Ampliação: 1000x (b) PCL/PVP 9:1 Ampliação: 2000x

**Figura 4.43:** Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PVP com agitação ultrassônica



(a) PCL/PEG 3:7 Ampliação: 1000x (b) PCL/PEG 3:7 Ampliação: 2000x



(c) PCL/PEG 9:1 Ampliação: 200x (d) PCL/PEG 9:1 Ampliação: 1000x

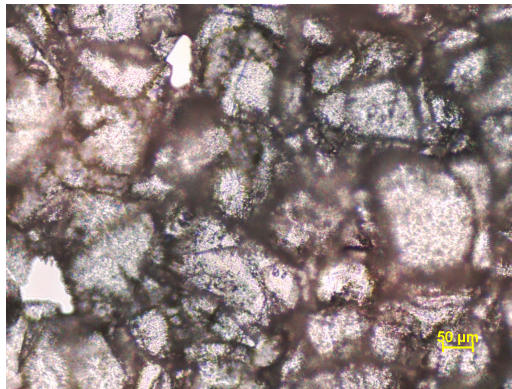
**Figura 4.44:** Imagens de SEM de filmes produzidos a partir de soluções de PCL/PEG com agitação ultrassônica

Em geral, verifica-se que a agitação ultrassônica conduz a uma melhor distribuição dos polímeros na solução em relação à agitação magnética, e conseqüentemente, no filme obtido, conforme se pretendia. Verificou-se que o peso molecular do polímero utilizado além do PCL tem também influencia na obtenção dos filmes através deste método. O polímero de menor peso molecular (PEG) permitiu obter mais poros e distribuídos mais uniformemente

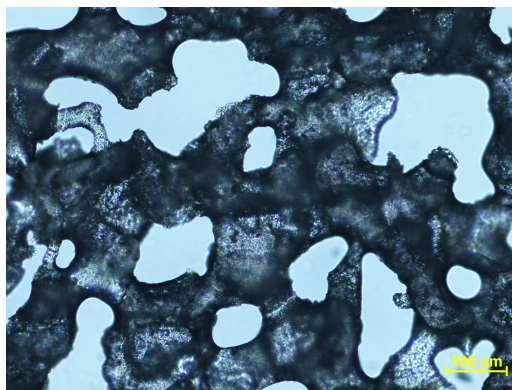
#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

em comparação com o PEO (polímero com estrutura semelhante mas com maior massa molecular).

As imagens de MO dos filmes obtidos por prensagem a quente e lixiviação de sais de granulometria entre 100 a 200 $\mu\text{m}$ , em filmes espalhados apresentam-se nas Figs.4.45 e 4.46. Pela observação da Fig.4.45 conclui-se que o método utilizado não permitiu que os grânulos de sal furassem o filme, possivelmente devido ao empacotamento e forma da superfície do sal. Quando realizada uma segunda prensagem e lixiviação do sal, a incorporação do sal foi facilitada pela existência de alguns poros e conduziu a um filme mais poroso, mas com poros irregulares, conforme se constata na Fig.4.46.



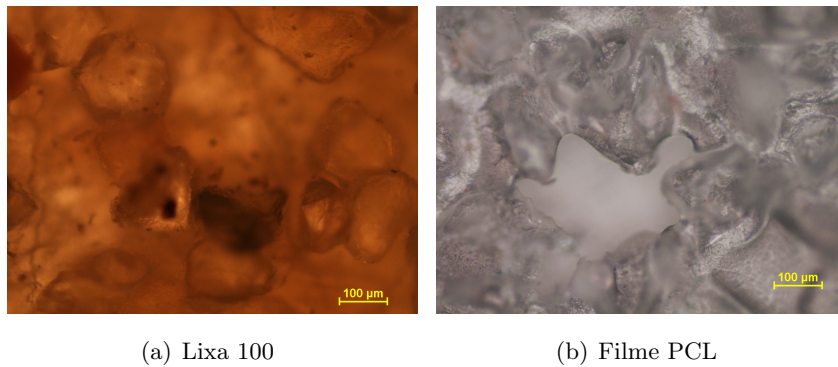
**Figura 4.45:** Imagem de MO de uma filme obtido por prensagem a quente e lixiviação de sais. Ampliação: 100x



**Figura 4.46:** Imagem de MO de uma filme obtido por dupla prensagem a quente e lixiviação de sais. Ampliação: 100x

Uma forma de evitar o empacotamento dos grãos de sal que pode conduzir à não abertura de poros é fixar a posição dos grãos. Para ensaiar este método foi utilizada uma lixa de granulometria 100 como modelo do conceito. O filme a prensar foi colocado entre duas folhas de lixa. A Fig.4.47 mostra o relevo da lixa e o resultado da prensagem.

#### CAPÍTULO 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



(a) Lixa 100

(b) Filme PCL

**Figura 4.47:** Imagens de MO da lixa 100 e de um filme resultante da prensagem a quente. Ampliação: 100x

Enquanto que o método de separação de fases sugere ser possível obter poros de dimensões e contornos regulares, estas características são mais difíceis de obter com o método de prensagem a quente e lixiviação de sais utilizando sal de forma irregular. Relativamente ao tamanho dos poros, a dimensão dos que se obtiveram com a técnica de separação de fases, é mais adequada ao fim em vista. No entanto, a utilização de sal de outras granulometrias permitiria reduzir o tamanho dos poros na técnica de prensagem. Um problema a resolver prende-se com a espessura dos filmes. Com a técnica de separação de fases obtiveram-se filmes demasiado finos e nos filmes obtidos por prensagem a espessura e a existência de poros abertos são variáveis dependentes relacionadas pelas dimensões e forma dos grãos de sal.



# 5

## Conclusões e Perspectivas Futuras

Foi objectivo deste trabalho produzir e caracterizar estruturas poliméricas destinadas ao desenvolvimento de um suporte poroso com uma topografia de fibras alinhadas para promover a regeneração da espinal medula. Pretendeu-se ainda estabelecer um protocolo de sementeira para averiguar se a linha celular N1E-115 se adequa ao estudo da resposta neuronal a materiais e assim comparar os diferentes estímulos químicos e topográficos proporcionados pelas matrizes às células.

Através da técnica de electrofiação, foram produzidas com sucesso matrizes de fibras de Gt, e de fibras compósitas de Gt/CS e Gt/PCL, nas proporções de 1:1, todas com diâmetros da ordem dos 450 nm. A gelatina foi escolhida como material de base por ser conhecida como promotora da adesão celular. Tendo sido usada gelatina de peixe, que é solúvel em água à temperatura ambiente, foi necessário proceder à sua reticulação.

Produziram-se matrizes de fibras com vários graus de anisotropia. O alinhamento das fibras foi induzido pela rotação de um colector cilíndrico. A análise da existência de um alinhamento preferencial das fibras foi efectuada recorrendo a um método baseado na FFT de imagens de SEM. Verificou-se que se obtém fibras essencialmente alinhadas para todas as composições estudadas, utilizando o colector cilíndrico a uma velocidade de rotação de 4000 rpm. Verificou-se ainda que as fibras de Gt/PCL apresentam um alinhamento preferencial, a velocidades de rotação relativamente mais baixas, superior ao das outras matrizes. Tal facto deve-se à presença do PCL na solução, o que contribui para a sua menor condutividade em relação às restantes soluções estudadas.

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

No que diz respeito à reticulação das matrizes de gelatina, a irradiação das mesmas com UV antes da exposição a vapor de GTA, não mostrou aumentar o grau de reticulação. Através da avaliação de perda de massa de matrizes de gelatina estabeleceu-se um tempo de 4h para a reticulação por exposição a vapor de GTA, obtido por evaporação a partir de uma solução a 50% em água para uma volume fechado, a 40°C. A partir das imagens de SEM, analisaram-se alterações morfológicas das fibras decorrentes da reticulação e que resultam da permanência das matrizes reticuladas em água. A análise dos espectros de FTIR de matrizes de Gt e Gt/CS permitiu confirmar a composição química das matrizes e o estabelecimento de ligações entre os grupo aldeído do GTA e o grupo amina da Gt e do CS. Concluiu-se que a estabilização das matrizes foi conseguida.

Durante o estudo da cultura celular foram encontradas várias dificuldades e apresentaram-se algumas soluções por forma a estabelecer um protocolo de cultura das células N1E-115 nas matrizes produzidas. Verificou-se que matrizes têm tendência a soltar-se das lamelas durante os procedimentos de cultura celular e por isso passaram a colocar-se sobre as matrizes anilhas de teflon, as quais não demonstraram ser citotóxicas, pois foi possível observar nos controlos com anilhas, o crescimento e diferenciação das células.

O teste de viabilidade celular colorimétrico das matrizes realizado mostrou uma elevada viabilidade celular relativamente aos controlos. Isto constitui uma boa indicação respeitante à não existência de citotoxicidade associada aos materiais e evidencia uma adequada esterilização das matrizes. No entanto, estes resultados foram insuficientes para permitir analisar a resposta celular às diferentes composições e topografias das matrizes, já que nas condições do ensaio as células podem ter aderido ao fundo do poço e não aos materiais. As observações de fluorescência das marcações dos núcleos não foram ainda bem sucedidas, ao que poderá não ser alheio um passo necessário para reduzir a autofluorescência exibida pelas matrizes devida ao processo de reticulação com GTA. Assim, o protocolo de sementeira e marcação das células N1E-115 deverá ser ainda melhorado. Como alternativa à marcação da actina-F com faloidina568, propõe-se a utilização de outro marcador do citoesqueleto que apresente picos de fluorescência a comprimentos de onda mais afastados dos correspondentes à autofluorescência devida à reticulação com GTA. Por exemplo, a utilização de faloidina488 (excitação/emissão: 495/518nm) possivelmente permitiria uma boa observação, evitando assim a utilização do boro-hidreto de sódio.

As estruturas porosas de PCL para suporte das matrizes de fibras, foram produzidas através de dois métodos, um deles baseado na separação de fases de polímeros imiscíveis e o outro na prensagem a quente e lixiviação de sais.

As imagens de SEM dos filmes obtidos, tirando proveito da separação de fases, revelaram que a distribuição dos poros varia tanto com a massa molecular do polímero como com a proporção dos polímeros na solução. Os parâmetros deste método deveriam ser ajustados no sentido de se obter domínios da fase solúvel em água bem distribuídos, para a obtenção de uma distribuição uniforme de poros. Para além da porosidade, um aspecto a ter em conta será o controlo da espessura dos filmes obtidos. Uma das dificuldades inerente a este método

## CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

é a elevada volatilidade do diclorometano. Possivelmente a lenta evaporação do solvente não foi totalmente garantida nas condições utilizadas. Isto poderia ser conseguido através da criação de uma atmosfera saturada de solvente, colocando um recipiente com diclorometano numa caixa bem vedada.

Quanto à caracterização dos filmes porosos de PCL obtidos pela prensagem a quente e lixiviação de sais, esta poderia ser complementada com a análise/quantificação da porosidade em função da massa de sal utilizada.

Perante os resultados da caracterização morfológica dos filmes obtidos pelos dois métodos, conclui-se que ambos são promissores, embora necessitem de optimização.

Os passos seguintes a este trabalho serão, naturalmente, a optimização da estrutura porosa de suporte e a deposição das fibras alinhadas sobre a estrutura escolhida. A partir deste conjunto poder-se-á então obter uma estrutura tubular, desenvolvendo assim uma NGC. Os testes *in vitro* permitirão avaliar as potencialidades desta NGC para estimular crescimento dos axónios. A utilização de uma linha celular (N1E-115 ou outra que se revelar mais adequada) poderá fornecer uma primeira indicação, mas seria importante confrontá-la com a resposta de células neuronais primárias. Poder-se-á então entrar seguidamente em fase de testes *in vivo*.

Seria também de grande interesse estudar o efeito da adição de factores de crescimento nervoso e testar a combinação de outras estratégias terapêuticas, tais como o transplante de células suportadas pela NGC para o local da lesão da espinal medula. O recurso a células estaminais, diferenciáveis quer em neurónios quer em células de suporte, poderá ser uma abordagem de sucesso.



# Bibliografia

- [1] A. Atala, J. A. Thomson, and R. Nerem, *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier, 2 ed., 2011.
- [2] P. A. Lim and A. M. Tow, “Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature,” *Annals of the Academy of Medicine*, vol. 36, pp. 49–57, Jan. 2007.
- [3] S. Thuret, L. D. F. Moon, and F. H. Gage, “Therapeutic interventions after spinal cord injury,” *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 7, pp. 628–43, Aug. 2006.
- [4] C. E. Schmidt and J. B. Leach, “Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration,” *Annual review of biomedical engineering*, vol. 5, pp. 293–347, Jan. 2003.
- [5] M. Wang, B. Sc, P. Zhai, X. Chen, D. Ph, D. J. Schreyer, X. Sun, and F. Cui, “Bioengineered scaffolds for spinal cord repair,” vol. 17, no. 3, pp. 177–194, 2011.
- [6] D. Hoffman-Kim, J. a. Mitchel, and R. V. Bellamkonda, “Topography, cell response, and nerve regeneration,” *Annual review of biomedical engineering*, vol. 12, pp. 203–31, Aug. 2010.
- [7] P. Tate, *Seeleys Principles of Anatomy and Physiology*. New York: McGraw-Hill, 2 ed., 2012.
- [8] C. V. Huijzen, *The Human Central Nervous System*. Berlin, Germany: Springer, 4 ed., 2008.
- [9] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley and Sons, Inc, 13 ed., 2012.
- [10] E. B. Marieb, P. B. Wilhelm, and M. J, *Human Anatomy*. San Francisco: Pearson Education, Inc., 6 ed., 2012.
- [11] S. I. Fox, *Human Phisiology*. New York: McGraw-Hill, 12 ed., 2011.
- [12] E. D. Robertis and E. M. D. Robertis Jr, *Biologia Celular e Molecular*. Lisboa, Portugal: Fundação Calouste Gulbenkian, 8 ed., 1996.

- [13] C. Watson, M. Kirkcaldie, and G. Paxinos, *The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy*. Elsevier, 1 ed., 2010.
- [14] G. M. Cooper, *A Célula: Uma Abordagem Molecular*. Lisboa, Portugal: Artmed editora, 2 ed., 2001.
- [15] W. K. Purves, D. Sadava, G. H. Orians, and H. C. Heller, *Life, The Science of Biology*. New York: Sinauer Associates, Inc, 6 ed., 2001.
- [16] A. J. Vander, J. H. Sherman, and D. S. Luciano, *Human Phisiology*. New York: McGraw-Hill, 6 ed., 1994.
- [17] J. H. Kordower and M. H. Tuszynski, *CNS Regeneration*. Elsevier, 2 ed., 2008.
- [18] G. Yiu and Z. He, “Glial inhibition of CNS axon regeneration.,” *Nature reviews. Neuroscience*, vol. 7, pp. 617–27, Aug. 2006.
- [19] P. Verma and J. Fawcett, “Spinal Cord Regeneration,” *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, vol. 94, pp. 43–66, 2005.
- [20] J. D. Bronzino, *Tissue Engineering and Artificial Organs*. Taylor & Francis, 3 ed., 2006.
- [21] J. W. Fawcett and R. A. Asher, “The glial scar and central nervous system repair,” *Brain research bulletin*, vol. 49, pp. 377–91, Aug. 1999.
- [22] L. L. Norman, K. Stroka, and H. Aranda-Espinoza, “Guiding axons in the central nervous system: a tissue engineering approach,” *Tissue engineering. Part B, Reviews*, vol. 15, pp. 291–305, Sept. 2009.
- [23] J. W. Fawcett, “Bridging spinal cord injuries,” *Journal of Biology*, vol. 7, pp. 1–3, Oct. 2008.
- [24] A. Subramanian, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, “Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration,” *Journal of biomedical science*, vol. 16, Nov. 2009.
- [25] R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of Tissue Engineering*. Elsevier, 3 ed., 2007.
- [26] X.-M. Xu and S. M. Onifer, “Transplantation-mediated strategies to promote axonal regeneration following spinal cord injury,” vol. 169, no. 2, pp. 171–182, 2009.
- [27] C. Lima, J. Pratas-Vital, P. Escada, A. Hasse-Ferreira, C. Capucho, and J. D. Peduzzi, “Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study,” *The journal of spinal cord medicine*, vol. 29, pp. 191–203, Jan. 2006.

- [28] C. Lima, P. Escada, J. Pratas-Vital, C. Branco, C. A. Arcangeli, G. Lazzeri, C. A. S. Maia, C. Capucho, A. Hasse-Ferreira, and J. D. Peduzzi, “Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury,” *Neurorehabilitation and neural repair*, vol. 24, pp. 10–22, Jan. 2010.
- [29] S. Stokols and M. H. Tuszynski, “The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 5839–46, Dec. 2004.
- [30] S. Martino, F. D’Angelo, I. Armentano, J. M. Kenny, and A. Orlacchio, “Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine,” *Biotechnology advances*, vol. 30, pp. 338–51, 2012.
- [31] G. N. Li and D. Hoffman-Kim, “Tissue-engineered platforms of axon guidance,” *Tissue Engineering: Part B*, vol. 14, no. 1, pp. 33–51, 2008.
- [32] S. S. Rao and J. O. Winter, “Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering,” *Frontiers in neuroengineering*, vol. 2, pp. 1–14, June 2009.
- [33] Y. Z. Zhang, Y. Feng, Z.-M. Huang, S. Ramakrishna, and C. T. Lim, “Fabrication of porous electrospun nanofibres,” *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 901–908, Feb. 2006.
- [34] W. E. Teo and S. Ramakrishna, “A review on electrospinning design and nanofibre assemblies,” *Nanotechnology*, vol. 17, pp. R89–R106, June 2006.
- [35] A. Greiner and J. H. Wendorff, “Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers,” *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 46, pp. 5670–703, Jan. 2007.
- [36] W.-j. Li, R. M. Shanti, and R. S. Tuan, “Electrospinning Technology for Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering,” *Nanotechnology for the Life Sciences*, vol. 9, pp. 135–187, Mar. 2006.
- [37] W. Cui, Y. Zhou, and J. Chang, “Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery,” *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2010.
- [38] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, “Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique,” *Biotechnology Advances*, vol. 28, pp. 325–347, Jan. 2010.
- [39] C. Burger, B. S. Hsiao, and B. Chu, “Nanofibrous Materials and their Applications,” *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 36, pp. 333–368, Apr. 2006.
- [40] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, “Produção de fibras de hidroxiapatite por electrofiação,” *Ciência e Tecnologia dos Materiais*, vol. 22, pp. 57–64, 2010.

- [41] C. Henriques, R. Vidinha, D. Botequim, J. P. Borges, and J. A. M. C. Silva, "A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 8, no. 12, pp. 1–11, 2008.
- [42] Y.-S. Lee and T. Livingston Arinzeh, "Electrospun nanofibrous materials for neural tissue engineering," *Polymers*, vol. 3, pp. 413–426, Feb. 2011.
- [43] D. Han and P.-I. Gouma, "Electrospun bioscaffolds that mimic the topology of extracellular matrix," *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, vol. 2, pp. 37–41, Mar. 2006.
- [44] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M.-H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Electrospun poly(epsilon-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4532–9, Dec. 2008.
- [45] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, and P. F. Nealey, "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 573–88, Mar. 1999.
- [46] S. Y. Chew, R. Mi, A. Hoke, and K. W. Leong, "The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on schwann cell maturation," vol. 29, no. 6, pp. 653–661, 2009.
- [47] C.-Y. Wang, K.-H. Zhang, C.-Y. Fan, X.-M. Mo, H.-J. Ruan, and F.-F. Li, "Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration," *Acta biomaterialia*, vol. 7, pp. 634–43, Feb. 2011.
- [48] G. Onose, A. V. Ciurea, R. E. Rizea, C. Chendreanu, A. Anghelescu, M. Haras, and F. Brehar, "Recent advancements in biomaterials for spinal cord injury complex therapeutics," *Digest Journal of Nanobiomaterials and Biostructures*, vol. 2, pp. 307–314, Dec. 2008.
- [49] Z.-M. Huang, Y. Zhang, S. Ramakrishna, and C. Lim, "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers," *Polymer*, vol. 45, pp. 5361–5368, July 2004.
- [50] S. Wang and L. Cai, "Polymers for Fabricating Nerve Conduits," *International Journal of Polymer Science*, vol. 2010, pp. 1–20, Aug. 2010.
- [51] J. Ratanavaraporn, R. Rangkupan, H. Jeeratawatchai, S. Kanokpanont, and S. Damrongsakkul, "Influences of physical and chemical crosslinking techniques on electrospun type a and b gelatin fiber mats," *International journal of biological macromolecules*, vol. 47, pp. 431–8, Nov. 2010.
- [52] Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, and S. V. Madihally, "In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 7616–27, Dec. 2005.



- [53] Y. Zhang, H. Ouyang, C. T. Lim, S. Ramakrishna, and Z.-M. Huang, "Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds," *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 72, pp. 156–65, Jan. 2005.
- [54] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: Properties and applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 31, pp. 603–632, July 2006.
- [55] X. Li, Z. Yang, A. Zhang, T. Wang, and W. Chen, "Repair of thoracic spinal cord injury by chitosan tube implantation in adult rats," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 1121–32, Feb. 2009.
- [56] G. Bozkurt, A. J. Mothe, T. Zahir, H. Kim, M. S. Shoichet, and C. H. Tator, "Chitosan channels containing spinal cord-derived stem/progenitor cells for repair of subacute spinal cord injury in the rat," *Neurosurgery*, vol. 67, pp. 1733–44, Dec. 2010.
- [57] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in Polymer Science*, vol. 32, pp. 762–798, Aug. 2007.
- [58] F. Chen, C. Lee, and S. Teoh, "Nanofibrous modification on ultra-thin poly( $\epsilon$ -caprolactone) membrane via electrospinning," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, pp. 325–332, Mar. 2007.
- [59] V. Beachley and X. Wen, "Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions," *Progress in polymer science*, vol. 35, pp. 868–892, July 2010.
- [60] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Bio-functionalized pcl nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, pp. 1129–1136, Oct. 2010.
- [61] M. Z. Elsabee, H. F. Naguib, and R. E. Morsi, "Chitosan based nanofibers, review," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, pp. 1711–1726, May 2012.
- [62] Y. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C. Lim, and S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer*, vol. 47, pp. 2911–2917, Apr. 2006.
- [63] K. Sisson, C. Zhang, M. C. Farach-Carson, D. B. Chase, and J. F. Rabolt, "Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability," *Biomacromolecules*, vol. 10, pp. 1675–80, July 2009.
- [64] R. Bhat and A. A. Karim, "Ultraviolet irradiation improves gel strength of fish gelatin," *Food Chemistry*, vol. 113, pp. 1160–1164, Apr. 2009.
- [65] S. Yunoki, T. Suzuki, and M. Takai, "Stabilization of low denaturation temperature collagen from fish by physical cross-linking methods," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 96, pp. 575–7, Jan. 2003.

- [66] UVP, *Ultraviolet Crosslinkers Operating Instructions and Service Manual*.
- [67] M. Azami, F. Moztarzadeh, and M. Tahriri, "Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques," *Journal of Porous Materials*, vol. 17, pp. 313–320, May 2009.
- [68] T.-H. Nguyen, "Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers," *Journal of Biomedical Science and Engineering*, vol. 03, pp. 1117–1124, Oct. 2010.
- [69] W. N. Chow, D. G. Simpson, J. W. Bigbee, and R. J. Colello, "Evaluating neuronal and glial growth on electrospun polarized matrices : bridging the gap in percussive spinal cord injuries," vol. 3, no. 2, pp. 119–126, 2008.
- [70] C. E. Ayres, G. L. Bowlin, R. Pizinger, L. T. Taylor, C. a. Keen, and D. G. Simpson, "Incremental changes in anisotropy induce incremental changes in the material properties of electrospun scaffolds," *Acta biomaterialia*, vol. 3, pp. 651–61, Sept. 2007.
- [71] C. E. Ayres, B. S. Jha, H. Meredith, J. R. Bowman, G. L. Bowlin, S. C. Henderson, and D. G. Simpson, "Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds : a users guide to the 2D fast Fourier transform approach," vol. 19, pp. 603–621, July 2008.
- [72] C. Ayres, G. L. Bowlin, S. C. Henderson, L. Taylor, J. Shultz, J. Alexander, T. A. Telemecco, and D. G. Simpson, "Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5524–34, Nov. 2006.
- [73] J. K. Alexander, B. Fuss, and R. J. Colello, "Electric field-induced astrocyte alignment directs neurite outgrowths," vol. 2, pp. 93–103, May 2008.
- [74] hpacultures, *Fundamental Techniques in Cell Culture: laboratory handbook*, 2 ed.
- [75] M. J. Simões, A. Gärtner, Y. Shirosaki, R. M. Gil da Costa, P. P. Cortez, F. Gartnër, J. D. Santos, M. A. Lopes, S. Geuna, A. S. P. Varejão, and a. C. Maurício, "In vitro and in vivo chitosan membranes testing for peripheral nerve reconstruction," *Acta médica portuguesa*, vol. 24, no. 1, pp. 43–52, 2011.
- [76] J.-e. Oh, K. R. Karlmark, J.-h. Shin, A. Pollak, A. Freilinger, M. Hengstschläger, and G. Lubec, "Differentiation of Neuroblastoma Cell Line N1E-115 Involves Several Signaling Cascades," *Neurochemical Research*, vol. 30, pp. 333–348, Mar. 2005.
- [77] R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. New York: Wiley-Liss, 4 ed., 2000.
- [78] Invitrogen, *PrestoBlue Cell Viability Reagent Protocol*. Life Technology Corporation, Oct 2010.

- [79] Invitrogen, *PrestoBlue Cell Viability Reagent Documentations*. Life Technology Corporation, Mar 2012.
- [80] H. Tsuji and T. Ishizaka, “Porous Biodegradable Polyesters . II . Physical Properties , Morphology , and Enzymatic and Alkaline Hydrolysis of Porous Poly (ε-caprolactone ) Films,” pp. 2281–2291, 2001.
- [81] D. H. GmbH, *UP50H/UP100H : Instruction manual*, 1994.
- [82] A. L. P. Marques, “Desenvolvimento de Suportes Biodegradáveis para Regeneração do Tecido Neuronal,” Master’s thesis, FCT-UNL, 2011.
- [83] A. R. Chandrasekaran, J. Venugopal, S. Sundarrajan, and S. Ramakrishna, “Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration,” *Biomedical materials*, vol. 6, pp. 1–10, Jan. 2011.
- [84] G. S. Al-Saidi, M. S. Al-Alawi, Rahman, and N. Guizani, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (*Lithrinus microdon*) skin : effects of extraction conditions,” vol. 19, no. 3, pp. 1167–1173, 2012.
- [85] S. Zivanovic, J. Li, P. M. Davidson, and K. Kit, “Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 1505–10, May 2007.
- [86] J. D. Schiffman and C. L. Schauer, “Cross-linking chitosan nanofibers,” *Biomacromolecules*, vol. 8, pp. 594–601, Feb. 2007.
- [87] L. Balau, G. Lisa, M. I. Popa, V. Tura, and V. Melnig, “Physico-chemical properties of Chitosan films,” *Central European Journal of Chemistry*, vol. 2, pp. 638–647, Dec. 2004.
- [88] T. Elzein, M. Nasser-Eddine, C. Delaite, S. Bistac, and P. Dumas, “FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces.,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 273, pp. 381–7, May 2004.



# Apêndice A - Protocolos de Cultura Celular

## A.1 - Esterilização das Matrizes

1. Imergir em etanol 70% durante cerca de 10min;
2. Lavar 2x com PBS;
3. Lavar 1x com água ultrapura para remover vestígios de etanol;
4. Irradiar com lâmpada UV da câmara de fluxo laminar durante 45 min, deixando a caixa de poços aberta.

## A.2 - Contagem das Células

1. Preencher as duas câmaras do hemocitómetro, utilizando uma pipeta de Pasteur, com as células da suspensão homogeneizada do frasco de cultura;
2. Contar o número de células presentes no campo de contagem (quadrado central), recorrendo ao microscópio óptico invertido com contraste de fase;
3. Calcular a concentração de células presentes na suspensão celular, através da equação 1

$$C = N \times 10^4 \quad (1)$$

, onde C representa o número de células existentes em 1 ml de suspensão celular (número de células/ml) e N a média do número de células viáveis observado.

## A.3 - Avaliação da Viabilidade Celular com PrestoBlue®

1. Adicionar reagente PrestoBlue® em cada poço da placa de cultura na proporção de 1:10 de meio, com as luzes apagadas;
2. Incubar na estufa (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) durante 1h;

3. Pipetar 3x 80 $\mu$ l de cada poço da placa de cultura para 3 poços numa placa de 96 poços, com as luzes apagadas;
4. Medir absorvância no leitor de absorvância com os filtros 570nm (excitação) e 600nm (emissão);
5. Calcular a percentagem de viabilidade celular relativa;

#### **A.4 - Fixação e Marcação das Células**

1. Retirar da estufa a placa de cultura e observar os poços dos controlos ao microscópio óptico invertido;
2. Descongelar (banho maria a 41°C) um tubo Falcon de 15ml de paraformaldeído (PFA a 4%) e realizar uma diluição com PBS para PFA a 2%;
3. Retirar dos poços o meio de cultura, pipetar 0.5ml de PFA a 2% para cada poço e deixar actuar durante 1 hora;
4. Lavar 3x com PBS;
5. Colocar 0.5ml de triton X-100 a 0.2% em cada poço e deixar actuar durante 30 min;
6. Lavar 3x com PBS;
7. Preparar, num tubo Falcon de 50ml, uma solução de 0.1% de boro-hidreto de sódio em PBS, pipetar 0.5ml para cada poço e deixar actura durante cerca de 5min;
8. Lavar 3x com PBS;
9. Colocar grupos de 4 amostras sobre 4 gotas de 100 $\mu$ l de DAPI (5 $\mu$ g/ml em PBS) sobre parafilme durante cerca de 30s/1min e reutilizá-las para todos os grupos de 4 amostras;
10. Colocar as amostras em placas de 4 poços e lavar 2x com PBS.