



Ana Cláudia Milheiro Santos de Aragão

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

Adesão, Migração e Proliferação de células em Matrizes de Fibras Alinhadas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: José Luís Ferreira, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Célia Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Gabriel Martins, Investigador Auxiliar, CBA-FCUL
Co-orientador: Gabriela Rodrigues, Professora Auxiliar, FCUL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário Secca
Arguente: Prof. Doutora Ana Aguiar Ricardo
Vogais: Prof. Doutor José Luís Ferreira
Prof. Doutor Gabriel Martins

Adesão,
migração e proliferação de células em matrizes de fibras alinhadas

Orientador: José Luís Ferreira, Professor auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Célis Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL
Co-orientador: Gabriela Rodrigues, Professora Auxiliar, FCUL
Co-orientador: Gabriel Martins, Investigador Auxiliar, CBA-FCUL

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Departamento de Física

Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

Dezembro de 2012

Direitos de Cópia

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem 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

Quero aproveitar esta oportunidade para exprimir os meus sinceros agradecimentos a todos os que me acompanharam ao longo deste trabalho e a todos, que aqui não constam, mas o tornaram possível.

Em primeiro lugar, ao meu orientador, Professor José Luís Ferreira, por toda a atenção, disponibilidade e pelo seu bom humor contagiante. Um apreço especial por toda a paciência, motivação e por tudo o que me ensinou.

Aos meus co-orientadores do grupo GREAT do Departamento de Física, Professor Jorge Silva e Professora Célia Henriques, por toda a ajuda, disponibilidade e interesse demonstrado ao longo deste trabalho. Ao Prof. Jorge Silva, em especial, por todo o acompanhamento nas reuniões e dedicação por este trabalho.

À Professora Gabriela Rodrigues e ao Doutor Gabriel Martins da Faculdade de Ciências da Universidade Nova de Lisboa, que possibilitaram as experiências de cultura celular e as observações por microscopia. Quero agradecer por toda a simpatia, tempo despendido e por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Ana Rita Rosa, Ana Sara Costa e Luís Martins, porque não imaginaria este trabalho de outra maneira, sem a vossa amizade e alegria.

Aos meus pais, um agradecimento muito especial e sentido, por tudo. Por tudo o que fazem por mim, pelo meu sucesso e felicidade e por todo o carinho e motivação.

Por último, quero agradecer ao meu namorado por toda a paciência, que eu bem sei que foi precisa, mas principalmente por todo o amor.

Resumo

A Engenharia de Tecidos tem revelado crescente sucesso ao proporcionar novas terapias na reparação e regeneração de danos funcionais e estruturais do corpo humano. Uma das ferramentas da Engenharia de Tecidos consiste na utilização de biomateriais na fabricação de substitutos temporários da matriz extracelular do tecido lesado. A manipulação da estrutura e composição desta matriz pode ser utilizada para direcionar o comportamento das células, facilitando o processo de regeneração.

Um dos grandes desafios da Engenharia de Tecido Vascular é criar condições que potenciem a migração das células do vaso sanguíneo nativo para o enxerto. Neste trabalho, foi realizado um estudo do comportamento de fibroblastos 3T3 em matrizes de fibras poliméricas produzidas por electrofiação.

Foram produzidas matrizes alinhadas e desalinhadas a partir de soluções com mistura dos polímeros Polivinilpirrolidona (PVP) e Policaprolactona (PCL) dissolvidos em Ácido Acético. Para impedir a dissolução do PVP, foram comparados diferentes tempos de reticulação das matrizes por irradiação com raios Ultra-Violeta. Verificou-se uma perda de massa de PVP inferior para maiores tempos de reticulação. Com base em medidas de ângulo de contacto, verificou-se que tempos de reticulação mais elevados também originaram matrizes com maior hidrofilicidade.

A morfologia e alinhamento das fibras obtidas foram analisados recorrendo a microscopia electrónica de varrimento (SEM).

A adesão celular foi observada e analisada por microscopia de fluorescência, tendo sido marcados os núcleos e o citoesqueleto das células. Nas matrizes de PVP/PCL foram observados agregados celulares e citoesqueleto reduzido. Já nas matrizes de PCL e nos controlos, as células aderiram fortemente exibindo filamentos extensos de actina. A viabilidade celular também foi quantificada recorrendo ao reagente PrestoBlueTM.

Por último, foi realizado um ensaio de migração celular numa matriz alinhada de PCL em *time-lapse* durante 20 horas e 30 minutos. Observou-se que as células migram na direcção do alinhamento, tendo sido estimada uma velocidade média para sete células de $16.3 \pm 3 \mu\text{m/hora}$.

Palavras-chave: Engenharia de Tecidos; Enxerto Vascular; Electrofiação.

Abstract

Tissue Engineering is a growing field of research that will allow for greater success in developing new therapies for the repair and regeneration of functional and structural damage in the human body. Among several strategies, Tissue Engineering seeks to manufacture temporary replacements for the extracellular matrix of damaged tissue using Biomaterials. The structure and composition of these *scaffolds* can be manipulated in order to guide cell behavior and promote tissue regeneration.

Despite growing success in Vascular Tissue Engineering, cell migration from native blood vessel to the graft remains a big challenge. In this context, this work pretends to provide a preliminary study for cell behavior in aligned electrospun polymer matrices.

Polyvinylpyrrolidone (PVP) and polycaprolactone (PCL) blends were electrospun to produce random and aligned matrices. To prevent PVP dissolution when in contact with body fluids, PCL/PVP matrices were cross-linked by irradiation with Ultra-Violet light. Contact angle measurements showed that higher PVP percentages improved matrix hydrophilicity.

Fiber morphology and alignment were analyzed using scanning electron microscopy (SEM).

Cell attachment was analyzed after labeling of the nuclei and cytoskeleton by observation with fluorescence microscopy. In arrays of PVP / PCL were observed cell aggregates and reduced cytoskeleton. Already in PCL matrices and controls, cells adhered strongly, showing extensive actin filaments. Cell viability was also quantified using the reagent PrestoBlue.

Cell adhesion, viability and proliferation were investigated by dying of nucleus and cytoskeleton and by PrestoBlueTM reagent essays. Cells revealed poor adhesion to PCL/PVP matrices, but were able to survive and proliferate. When cultured in PCL, cells revealed good adhesion and integration within the matrix. For cell migration essay, 3T3 cells were cultured in aligned PCL matrix and photographed in *time-lapse* mode for 20 hours. Migration in direction of fiber alignment was verified for every fast-moving cells.

Keywords: Tissue Engineering; Vascular graft; Electrospinning; Guided cell behaviour.

Índice

Índice	xiv
Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Lista de Siglas	xxi
Enquadramento	1
1 Introdução	3
1.1 Anatomia, estrutura e organização dos vasos sanguíneos	4
1.2 Produção de <i>scaffolds</i>	6
1.3 Polímeros	7
1.3.1 Polivinilpirrolidona (PVP)	8
1.3.2 Policaprolactona (PCL)	9
1.4 Mecanismos de adesão, migração e proliferação celular	10
1.4.1 Adesão	10
1.4.2 Migração	12
2 Materiais e Métodos	15
2.1 Produção de Matrizes	15
2.1.1 Preparação das Soluções Poliméricas	15
2.1.2 Equipamento e Processo de Electrofiação	17
2.1.3 Reticulação das Matrizes	18
2.2 Caracterização das Matrizes	18
2.2.1 Morfologia das Fibras	18
2.2.2 Perda de Massa	19
2.2.3 Ângulo de Contacto	20
2.3 Cultura Celular	21
2.3.1 Adesão	22
2.3.2 Proliferação	25
2.3.3 Viabilidade	25

2.3.4 Migração	26
3 Apresentação e Discussão de Resultados	27
3.1 Produção das Matrizes	27
3.1.1 Propriedades das Soluções Poliméricas	28
3.1.2 Parâmetros de Electrofiação	32
3.2 Caracterização das Matrizes	35
3.2.1 Morfologia	35
3.2.2 Perda de Massa	42
3.2.3 Ângulos de Contacto	42
3.3 Cultura Celular	46
3.3.1 Adesão	46
3.3.2 Proliferação	53
3.4 Viabilidade	53
3.5 Migração	54
4 Conclusões e Perspectivas	57
Bibliografia	62
Apêndice-A	63
Apêndice-B	65
Apêndice-C	67
Apêndice-D	69

Lista de Figuras

1.1	Anatomia e organização dos tecidos de uma artéria e de uma veia. Imagem adaptada: Fox, Stuart I. Human Physiology 4th Brown Publishers.	5
1.2	Matriz Extracelular em relação ao Epitélio, Endotélio e Tecido Conjuntivo. .	6
1.3	Esquema típico de electrofiação	7
1.4	Polivinilpirrolidona.	8
1.5	Policaprolactona.	9
1.6	Correlação entre a extensão da área de adesão e o comportamento celular subsequente.	12
1.7	Etapas do processo de migração das células endoteliais.	13
2.1	Equipamentos de Electrofiação com dois tipos de colector.	18
2.2	Equipamento e <i>software</i> utilizados nas medições dos ângulos de contacto. . .	20
2.3	Placa de cultura multi-poços do 1 ^a ensaio de adesão.	23
2.4	Placa de cultura multi-poços do 2 ^a ensaio de adesão.	24
2.5	Placa de cultura multi-poços utilizada no 4 ^a ensaio de adesão.	25
3.1	Efeito na dispersão da deposição no colector com a variação da concentração de PCL/PVP em Clorofórmio.	28
3.2	Efeito na morfologia das fibras com a variação da concentração (em %p/p) de PCL/PVP em Ácido Acético.	29
3.3	Efeito no diâmetro das fibras em função da concentração (em %p/p) de PCL/PVP em Clorofórmio.	29
3.4	Efeito na deposição em função do Solvente utilizado para concentrações de 14% PCL/PVP.	30
3.5	Efeito na morfologia das fibras obtidas por electrofiação de soluções com diferentes solventes.	31
3.6	Solução de 14% PCL/PVP em Ácido Acético vista no microscópio óptico com ampliações 100X (a) e 500X (b).	32
3.7	Morfologia das fibras depositadas em função da Tensão aplicada (kV) da solução de 14% PVP/PCL em Ácido Acético.	33
3.8	Morfologia das fibras depositadas em função do Fluxo (ml/h) numa solução de 10% PVP/PCL em Ácido Acético com aplicação 500X.	33

3.9	Morfologia das fibras depositadas em função do Fluxo (ml/h) numa solução de 16% PVP/PCL em Ácido Acético com tensão aplicada 12 kV e distância 20 cm (500X).	34
3.10	Efeito na deposição das fibras produzidas por electrofiação da solução de 14% PCL/PVP em Ácido Acético com tensão aplicada 12 kV e fluxo 1,0 ml/h.	34
3.11	Efeito no alinhamento das fibras depositadas com a velocidade do colector.	35
3.12	Aspecto das fibras de PVP reticuladas durante 8h antes (a) e após imersão em água (c).	36
3.13	Matrizes desalinhada (250 rpm) e alinhada (4000 rpm) de PCL e respectivas distribuições dos ângulos e diâmetros.	37
3.14	Imagens de SEM de matrizes de PCL/PVP pós-produção com respectivos histogramas de distribuição dos diâmetros das fibras.	38
3.15	Matrizes de PCL/PVP com vários tempos de reticulação após imersão em água destilada durante 1h no agitador orbital.	39
3.16	Esquema de electrofiação de uma emulsão de PCL e fibroína de seda.	40
3.17	Distribuições dos diâmetros das fibras de PVP/PCL após imersão em água com tempos de reticulação: b) 5 min, c) 10 min, d) 15 min e) 20 min, d) 25 min e 60 min.	41
3.18	Percentagem de perda de massa das fibras de PVP/PCL em função do tempo de reticulação.	42
3.19	Ângulos de contacto medidos ao longo do tempo em matrizes desalinhadas de PCL/PVP com tempos de reticulação: 0, 5, 10, 30 e 60 minutos.	44
3.20	Medições dos ângulos de Contacto da matriz de PCL.	45
3.21	Ângulos de Contacto das matrizes de PCL, PCL/PVP 0, PCL/PVP 5, PCL/PVP 10, PCL/PVP 30 e PCL/PVP 60 ao longo do tempo.	45
3.22	Células aderidas a lamelas de vidro em poços de um Controlo positivo e de um Teste de citotoxicidade à Cola de vácuo	46
3.23	Fibroblastos 3T3 em matrizes de PVP/PCL com diferentes tempos de reticulação.	47
3.24	Comparação da matriz de PCL com a matriz de PVP/PCL0 após dissolução do PVP.	48
3.25	Núcleos das células aderidas às matrizes e controlos no 2º ensaio de adesão celular.	50
3.26	Núcleos das células aderidas às matrizes e controlos no 3º ensaio de adesão celular.	51
3.27	Núcleos das células aderidas às matrizes e controlos no 3º ensaio de adesão celular.	52
3.28	Matrizes de PCL/PVP 5 e PCL/PVP 30 após um e três dias em cultura.	53
3.29	Medições de Absorvância resultantes do ensaio de viabilidade celular.	54

3.30	Imagens do início e fim do ensaio de migração celular, com o percurso seguido de sete células.	55
------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Lista de Tabelas

2.1	Polímeros utilizados na produção de fibras por electrofiação.	16
2.2	Solventes utilizados na fabricação de fibras por electrofiação.	16
2.3	Soluções preparadas para o estudo de electrofiação.	16
3.1	Diâmetro médio das fibras de PCL/PVP após imersão em água.	41
3.2	Distâncias percorridas e velocidades médias das sete células seguidas durante o ensaio de migração (20h30, 205 imagens).	56

LISTA DE TABELAS

Lista de siglas

3T3 - *3-day transfer, inoculum 3 x 10⁵ cells*

Au - Ouro

BSA - Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*

DCV - Doenças cardiovasculares

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ePTFE - Politetrafluoretileno expandido

ETV - Engenharia de Tecido Vascular

FBS - Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*)

FCT-UNL - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

FC-UL - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

HEPES - Hidroxietil-1-piperazinoetanossulfónico

MACs - Moléculas de Adesão Celular

MEC - Matriz Extracelular

m_{inicial} - Massa inicial

m_{seca} - Massa seca

p/p - Fracção massa/massa

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PCL - Policaprolactona

Pd - Paládio

PES - Polietersulfona

PFA - Paraformaldeído

PGA - Poli(ácido glicólico)

PLLA - Poli(ácido láctico)

PSf - Polisulfona

PVP - Polivinilpirrolidona

rpm - rotações por minuto

SEM - *Scanning electron microscope*

UV - Ultra-Violeta

Enquadramento

As doenças cardiovasculares (DCV), em especial doenças das artérias coronárias causadas pela arteriosclerose, prevalecem como a principal causa de morte e morbilidade a nível mundial [1]. As terapias usualmente aplicadas no tratamento destas patologias tais como a angioplastia, a colocação de *stents* e a cirurgia de revascularização (*bypass*) estão amplamente dependentes da severidade da doença e da condição atual do paciente [2]. Para além disso, no caso da cirurgia de revascularização, dá-se preferência à utilização de vasos sanguíneos autólogos, ou seja, vasos removidos de uma zona saudável do próprio paciente e transplantados para a zona que requer vascularização [2]. No entanto, pacientes com DCV muitas vezes não possuem vasos sanguíneos adequados para esta cirurgia e, se possuírem, terão de ser sujeitos a uma segunda cirurgia para remoção dos vasos, correndo o risco de afectar uma região previamente saudável. Neste sentido, tem vindo a emergir uma necessidade de enxertos substitutos alternativos.

Os enxertos artificiais utilizados correntemente (Dacron® e ePTFE) são bem sucedidos quando aplicados a zonas de elevado fluxo sanguíneo e vasos com diâmetros de grandes dimensões. No entanto, a superfície do material falha em favorecer um revestimento de células endoteliais, permanecendo trombogénica e, portanto, gerando uma resposta imunológica desfavorável que conduz à inflamação crónica. Por este motivo, estes materiais não são bons candidatos como enxertos de vasos de pequenos diâmetros (< 6 mm) [3, 4]. Nestes, o fluxo sanguíneo é mais lento e os constituintes do sangue permanecem mais tempo em contacto com a superfície do enxerto, aumentando a probabilidade de desencadear uma resposta imunológica .

A Engenharia de Tecidos tem estudado várias técnicas de produção de enxertos hemocompatíveis, que previnam a resposta inflamatória que causa a falha do enxerto. Neste contexto, formula-se a hipótese de que um enxerto tubular que possua uma microestrutura em fibras alinhadas longitudinalmente poderá conduzir à migração facilitada e guiada das células do vaso nativo para o biomaterial, em particular a migração das células endoteliais para a superfície interna do enxerto, permitindo o desenvolvimento mais rápido do revestimento não trombogénico.

Esta Dissertação foi realizada no âmbito da Engenharia de Tecidos, em particular do

Tecido Vascular, integrada no Grupo de Engenharia de Tecidos do Departamento de Física da FCT-UNL. O principal objectivo consistiu no desenvolvimento de matrizes de biomateriais por electrofiação e na avaliação do seu desempenho na adesão, migração e proliferação celular, tendo em vista a sua aplicação no desenvolvimento de enxertos tubulares de pequeno diâmetro.

A escolha dos biomateriais a usar recaiu sobre a Polivinilpirrolidona (PVP) e a Policaprolactona (PCL), tendo-se usado matrizes com diferentes proporções destes polímeros. A dissertação tem quatro capítulos principais. No primeiro são apresentados conceitos teóricos considerados úteis para a fundamentação deste trabalho e compreensão dos resultados obtidos. Entre estes destacam-se a organização do tecido vascular, os mecanismos de adesão celular, a técnica de Electrofiação e os polímeros utilizados.

No segundo capítulo são descritos os equipamentos, materiais e processos de produção das matrizes bem como da sua caracterização. Também são descritos os vários procedimentos e técnicas utilizados para avaliar o comportamento de células nas matrizes.

Os resultados são apresentados e discutidos em etapas, no quarto capítulo, das quais se destacam a caracterização das soluções, das matrizes e do comportamento das células nas matrizes (adesão, proliferação, viabilidade e migração).

Finalmente, no último capítulo são resumidas as conclusões principais tiradas ao longo do trabalho e feitas algumas sugestões para aprofundar os conhecimentos obtidos.

1

Introdução

A Engenharia de Tecidos é uma área científica que envolve a aplicação dos conhecimentos da Engenharia e das Ciências da Vida para uma compreensão fundamental dos mecanismos envolvidos nos tecidos de mamíferos. Para além desta busca pelo conhecimento, a Engenharia de Tecidos tem também como objectivo a produção de substitutos biológicos que visam reparar ou regenerar um órgão ou tecido e devolver, manter ou melhorar a sua função [5].

Todos estes objectivos passam pelo estudo da relação entre a estrutura de um órgão ou tecido e a sua função. Para tal, são utilizados três componentes básicos constituintes da característica tríade da Engenharia de Tecidos:

Scaffolds: Estruturas produzidas para dar apoio à regeneração do novo tecido substituindo temporariamente a matriz extracelular;

Células: Podem ser semeadas *in vitro* nos *scaffolds* ou mobilizadas *in vivo*;

Sinais químicos e mecânicos: Fornecidos através da utilização de moléculas e factores de crescimento, através da manipulação da estrutura dos *scaffolds*, da aplicação de forças, entre outros [6].

A Engenharia de Tecido Vascular (ETV), em particular, encontra grandes desafios, já que os vasos sanguíneos são estruturas altamente organizadas que se encontram sob a tensão constante do fluxo sanguíneo.

Os principais desafios consistem na produção de enxertos com resistência e complacência adequadas, biodegradação compatível com a regeneração de tecido novo e a obtenção do revestimento interno não trombogénico.

1.1 Anatomia, estrutura e organização dos vasos sanguíneos

Os vasos sanguíneos podem ser divididos em três grandes categorias: as artérias, as veias e os capilares. As artérias e as veias possuem a sua estrutura tubular organizada em três camadas (ou túnicas) concêntricas relativamente distintas. Do lúmen para a superfície externa do vaso sanguíneo respetivamente, estas camadas designam-se por túnica íntima, túnica média e túnica externa (ou adventícia).

A túnica íntima é constituída por endotélio, membrana basal e lâmina própria. A membrana basal e a lâmina própria são ambas constituídas essencialmente por tecido conjuntivo e por uma camada de fibras elásticas designada por membrana elástica íntima que separa a túnica íntima da túnica média. O endotélio, por outro lado, é constituído por células. Estas células endoteliais formam uma camada confluyente que reveste o interior do vaso, encontrando-se em contacto directo com o sangue. O endotélio possui diversas funções fisiológicas importantes *in vivo* e em Engenharia de Tecidos é particularmente importante a sua função no controlo das respostas imunitárias e inflamatórias. Ao secretarem moléculas específicas como o óxido nítrico, as células endoteliais inibem a activação das plaquetas sanguíneas prevenindo a formação de trombos.

A túnica média é constituída por células musculares lisas, fibras elásticas e colagénio em quantidades variáveis dependendo do diâmetro, do tipo e da localização *in vivo* do vaso sanguíneo. As células do músculo liso encontram-se alinhadas circunferencialmente e organizadas numa cama responsável pela regulação do fluxo sanguíneo. Ao contraírem, ocorre o que se designa por vasoconstrição que leva à diminuição do diâmetro interno do vaso e à diminuição do fluxo sanguíneo. Ao relaxarem ocorre a vasodilatação, ou seja, um aumento do diâmetro interno do vaso e consequentemente do fluxo sanguíneo [7].

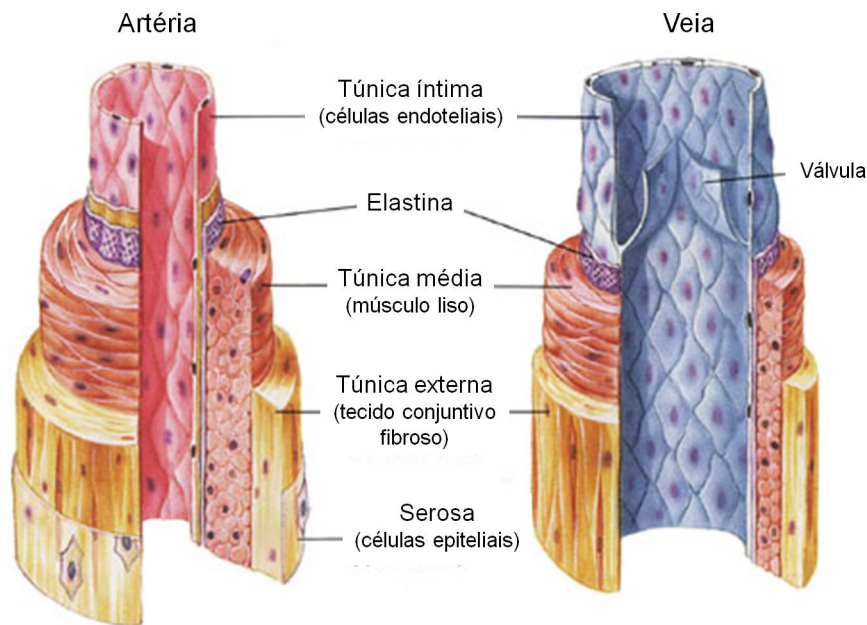


Figura 1.1: Anatomia e organização dos tecidos de uma artéria e de uma veia. Imagem adaptada: Fox, Stuart I. Human Physiology 4th Brown Publishers.

Por último, a túnica externa é constituída principalmente por tecido conjuntivo de densidade variável, sendo mais denso na proximidade da túnica média e tornando-se menos denso até se fundir com o tecido conjuntivo que envolve o vaso (Fig.1.2). A componente celular limita-se normalmente a células produtoras da matriz extracelular tais como os fibroblastos.

Como em qualquer outro tecido, também o tecido vascular é constituído na sua maioria por Matriz Extracelular (MEC). A matriz extracelular é produzida por células e desempenha funções importantes e essenciais para a organização e funcionalidade dos tecidos, não só no crescimento, mas também nos mecanismos de cicatrização e regeneração [8, 9]. Entre elas, (1) proporciona-lhes propriedades biomecânicas, (2) forma uma estrutura tri-dimensional bioativa ao longo da qual as células podem aderir e migrar; (3) influencia o fenótipo das células fornecendo sinais mecânicos e moleculares já que (4) serve como âncora para várias proteínas incluindo factores de crescimento e enzimas.

Na sua composição, a MEC possui principalmente colagénio (tipos I e III), elastina, proteoglicanos e glicoproteínas. O colagénio proporciona rigidez para a resistência contra a ruptura e a elastina é a responsável pelas propriedades elásticas do tecido, prevenindo, juntamente com o colagénio, a deformação permanente do vaso sanguíneo com o fluxo pulsátil.

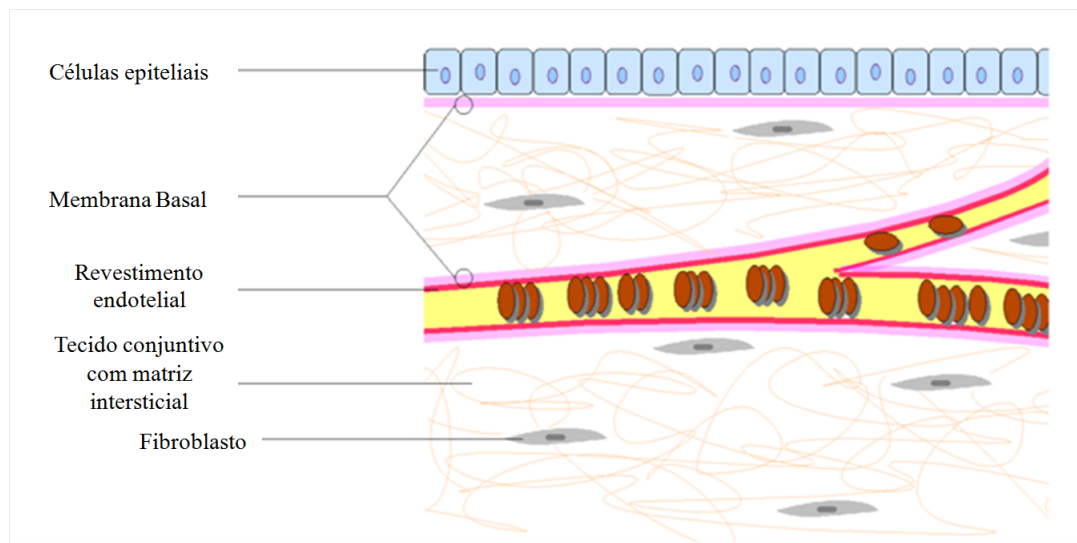


Figura 1.2: Matriz Extracelular em relação ao Epitélio, Endotélio e Tecido Conjuntivo.

Disponível *on-line* em <http://en.wikipedia.org/wiki/Basement-membrane>.

1.2 Produção de *scaffolds*

Na produção de *scaffolds*, a Engenharia de Tecidos tem de ter em conta uma diversidade de características dos materiais a utilizar. Como materiais implantáveis que visam substituir temporariamente a matriz extracelular de um tecido, devem possuir determinadas características tais como: (1) ser biocompatíveis, (2) biodegradáveis, (3) de fácil processamento e maleabilidade na construção das estruturas desejadas, (4) possuir rigidez e estabilidade mecânica, (5) ser esterilizável, entre outros.

A técnica de Electrofiação na fabricação de *scaffolds* permite a obtenção de membranas porosas constituídas por fibras poliméricas que no seu conjunto se assemelham à intrincada estrutura tri-dimensional da matriz extracelular dos tecidos [10]. Devido à sua simplicidade e baixo custo de produção e de investimento, a electrofiação tem sido vastamente utilizada em Engenharia de Tecidos, possibilitando a fabricação de malhas fibrosas a partir de uma grande variedade de polímeros naturais e sintéticos. Também na Engenharia de Tecido Vascular, esta técnica tem provado grande potencial sendo cada vez mais estudada [11, 12, 13, 14]. Para esta técnica os polímeros são dissolvidos em solventes voláteis que evaporam durante o processo, formando uma malha polimérica sólida.

A montagem típica de um equipamento de electrofiação consiste numa seringa ligada a uma bomba infusora que controla o fluxo de saída da solução pela agulha, uma fonte de alta voltagem e um colector [15].

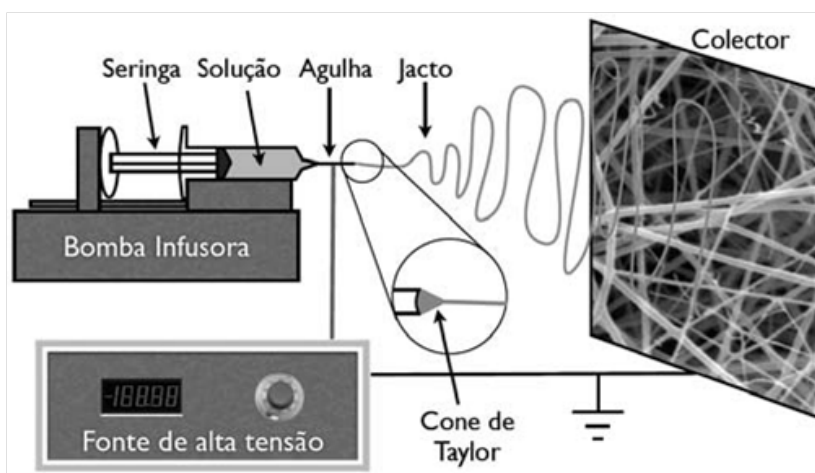


Figura 1.3: Esquema típico de electrospiação [16].

Durante o processo de electrospiação, é formada uma pequena gota de solução na ponta da agulha que se encontra estável nesta forma devido à tensão superficial da solução polimérica. A quantidade de solução que sai pela agulha da seringa é controlada através de uma bomba infusora na qual se configura o volume de solução a ejetar. Ao aplicar um campo eléctrico entre a agulha e o colector, as cargas eléctricas da solução são induzidas repelindo-se entre si. Quando a força electrostática prevalece à tensão superficial, ocorre a projecção de um jacto de solução que resulta na formação de um cone de Taylor (fig: 1.3). Este jacto parte da agulha onde foi aplicada a alta tensão e viaja na direcção do menor potencial, sendo este o colector, que se encontra ligado à terra. Ao longo do percurso entre a agulha e o colector, grande parte do solvente evapora e é apenas depositado o polímero no seu estado sólido e em forma de fibras, cuja espessura pode variar entre a ordem dos nanómetros até vários micrómetros [15, 17].

A morfologia das fibras obtidas depende dos parâmetros da solução polimérica, dos parâmetros do processo de electrospiação e de condições ambientais tais como a temperatura e a humidade. Entre os parâmetros da solução polimérica destacam-se o peso molecular e viscosidade, a tensão superficial e a condutividade da solução. Dos parâmetros de electrospiação, destacam-se o efeito da tensão aplicada, do fluxo, da distância entre a agulha e o colector e o efeito do colector [15].

1.3 Polímeros

Os polímeros escolhidos para alvo de estudo neste trabalho foram a Polivinilpirrolidona (PVP) e a Policaprolactona (PCL). Estes dois polímeros possuem características muito diferentes um do outro, mas ambos possuem propriedades de grande interesse para a fabricação de um enxerto vascular.

O PCL é vastamente estudado com este objectivo devido às suas boas propriedades mecânicas e adequadas para este tipo de implante. No entanto, já foi reportado que a sua hidrofobi-

cidade pode ser demasiado elevada para uma óptima adesão celular e que a sua utilização neste tipo de enxertos pode resultar numa resposta imunitária com formação de trombos e falha do enxerto.

Por outro lado, o PVP é um polímero hidrofílico e não trombogénico sendo até utilizado como expansor do plasma sanguíneo. A electrofiação destes dois polímeros individualmente tem sido estudada e realizada com sucesso a partir de soluções com várias concentrações e solventes. No entanto, a mistura destes polímeros consta pouco na literatura e será estudada ao longo deste trabalho.

1.3.1 Polivinilpirrolidona (PVP)

A polivinilpirrolidona (PVP) é um polímero sintético e solúvel em água e outros solventes polares e é conhecido pela sua boa biocompatibilidade. Pode também ser designado comumente por Povidona e é composto pela repetição de vinilpirrolidonas (Fig).

O PVP começou por ser utilizado como expansor do plasma sanguíneo possuindo, mais tarde, diversas outras aplicações tais como na área dos biomateriais e revestimentos, em lentes de contacto, desinfectantes, lentes intra-oculares, na área da medicina por exemplo como substituto de humor vítreo, nas áreas farmacêutica, alimentar e cosmética como revestimento ou espessante, entre outras.

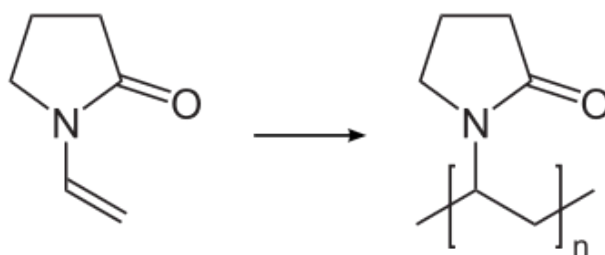


Figura 1.4: Polivinilpirrolidona. Disponível *on-line* na página <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidone>.

Na área da Engenharia de Tecidos, o PVP é conhecido pelas suas boas capacidades de interação com materiais hidrofílicos e hidrofóbicos e por melhorar a hidroflicidade e hemo-compatibilidade de substratos para obter melhor adesão celular e menor trombogenicidade, respectivamente. Por exemplo, Fei Xu et al (2009) comprovaram o aumento da citocompatibilidade de microfibras de Ácido Poliláctico (PLLA) obtidas por electrofiação através da mistura de PVP. Nesse estudo, foi verificado que a adição de PVP conduziu a um aumento da hidroflicidade das fibras de PLLA, a um aumento da proliferação de células vasculares do músculo liso ao longo da matriz de PLLA/PVP e a um aumento da hemocompatibilidade de filmes de PLLA/PVP, comparativamente a filmes de PLLA. Também se verificou, nestes últimos, uma maior adesão e agregação de plaquetas sanguíneas [18].

Ran Fen et al (2011) também comprovaram um aumento da hidrofilicidade de membranas de Polietersulfona (PES) com a adição de PVP através de medições dos ângulos de contacto e do estudo da adsorção de proteínas; um aumento da hemocompatibilidade através de estudos de adesão, activação e agregação de plaquetas sanguíneas e do tempo de coagulação; e um aumento da citocompatibilidade das membranas através da cultura celular de hepatócitos humanos embrionários [19]. Noutro estudo realizado por Akon Higuchi et al (2002) verificou-se o aumento da hidrofilicidade de membranas de Polisulfona (PSf) com a adição de PVP, tal como a redução da adsorção de proteínas e a supressão da adesão de plaquetas comparativamente a membranas com apenas PSf e com membranas de PSf com outros tratamentos de superfície [20].

O PVP é solúvel em água, mas pode ser reticulado para impedir a sua rápida dissolução quando em contacto com o meio biológico. Esta reticulação pode ser realizada através da irradiação com Ultra-Violeta (UV). As reacções fotoquímicas consequentes produzem a formação de radicais intermediários, um requisito fundamental para ocorrer reticulação. A recombinação destes radicais conduz à formação de ligações covalentes cruzadas na rede polimérica, tornando-a insolúvel em água [21, 22, 23].

1.3.2 Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático biodegradável que pode ser sintetizado de maneira económica através da polimerização por abertura de anel da epsilon-caprolactona utilizando um catalisador (ver fig. 1.5).

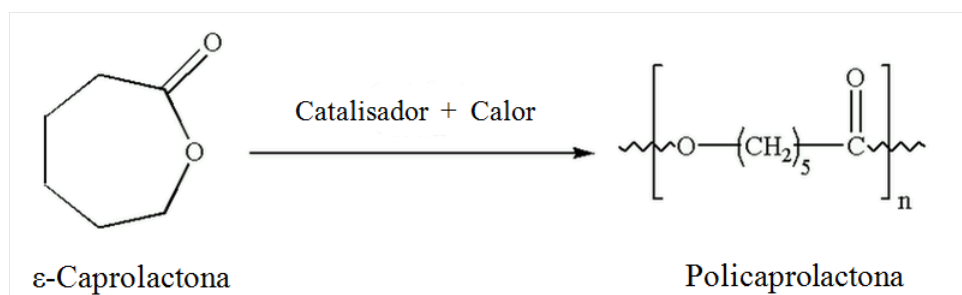


Figura 1.5: Policaprolactona. Disponível *online* na página <http://en.wikipedia.org/wiki/Polycaprolactone>.

O produto resultante desta reacção, o PCL, é um polímero hidrofóbico solúvel em diversos solventes orgânicos. O seu baixo ponto de fusão (59-64°C), boas propriedades mecânicas e excepcional compatibilidade em misturas com outros polímeros tem estimulado uma extensa pesquisa do seu potencial em aplicações biomédicas e também na Engenharia de Tecido Vascular [24, 25, 26, 27, 28].

Comparativamente com outros polímeros utilizados em Engenharia de Tecidos como

o PGA ou o PLA, o PCL possui um tempo de degradação significativamente mais longo devido à sua hidrofobicidade e semi-cristalinidade[29]. Esta característica torna este biomaterial especialmente adequado para sistemas implantáveis de relativo longo prazo. No caso da implantação de um enxerto vascular, é de extrema importância que a degradação do material não ocorra antes de ter havido regeneração de tecido suficiente para suportar o armazenamento do sangue no seu interior.

Os mecanismos de degradação da policaprolactona podem ser de dois tipos: hidrolítica ou enzimática. Em ambos os casos, os produtos de degradação resultantes são oligómeros que contêm grupos carboxilo e que, em condições fisiológicas, são eliminados por macrófagos e células gigantes. Como material biocompatível, nem o PCL nem os seus produtos de degradação são considerados tóxicos para o organismo [30].

O PCL tem sido vastamente estudado na fabricação de *scaffolds* em Engenharia de Tecido Vascular através da técnica de electrofiação, por exemplo Sarra de Valence et al. (2011) produziram um enxerto vascular através da electrofiação de PCL e avaliou o seu desempenho a longo termo *in vivo*. Nesse estudo concluíram que o PCL possui excelentes propriedades mecânicas para aplicação como enxerto vascular, apesar de não terem obtido regeneração de tecido novo suficiente relativamente à taxa de degradação do PCL [14]. Noutro estudo, McClure et al. (2010) electrofiaram matrizes com diferentes proporções de PCL, Elastina e Colagénio para produzir três camadas diferentes de um enxerto vascular com propriedades mecânicas semelhantes ao vaso sanguíneo nativo [12]. O PCL também já demonstrou suportar a adesão, proliferação e migração de células, no entanto pode ser considerado demasiado hidrofóbico para obter a adsorção de proteínas necessárias para promover uma óptima adesão celular. Por este motivo é frequente o estudo do PCL com misturas ou revestimentos de polímeros naturais e/ou hidrofílicos [26, 28].

1.4 Mecanismos de adesão, migração e proliferação celular

1.4.1 Adesão

A adesão celular é o processo através do qual as células animais reconhecem e se ligam entre si e à matriz extracelular migrando através desta e organizando-se em estruturas complexas como os tecidos e órgãos. Este processo ocorre através de junções que podem ser divididas em três classes:

Junções oclusivas: Unem células de um tecido epitelial selando esta camada até à passagem de pequenas moléculas;

Junções aderentes: Ligam as células a células vizinhas ou à matriz extracelular;

Junções comunicantes: Medeiam a passagem de sinais eléctricos e químicos entre células adjacentes [31].

Tendo em conta os objectivos deste trabalho, serão abordados brevemente, apenas mecanismos de adesão das células à matriz extracelular e a outro tipo de substratos (junções aderentes).

Adesão à matriz Extracelular

A adesão das células à matriz extracelular ocorre principalmente através de adesões focais e hemidesmosomas e são constituídas por moléculas de adesão celular (MACs) existentes na superfície das células. Estas moléculas são proteínas transmembranares da família das integrinas que funcionam como receptores unindo componentes do citoesqueleto da célula a componentes (moléculas ligantes) da matriz extracelular, tais como a fibronectina e a laminina. A principal diferença entre as adesões focais e os hemidesmosomas consiste no componente do citoesqueleto que é ligado à matriz extracelular. Nas primeiras a matriz liga-se aos filamentos de actina e nos segundos aos filamentos intermédios [31].

Adesão celular a materiais artificiais

A interacção entre células e materiais artificiais pode ser mediada através de moléculas ligantes da MEC ou sem a intervenção destas. Neste segundo caso, a interacção ocorre apenas através de ligações químicas, tais como pontes de Hidrogénio e ligações polares ou iónicas entre algumas moléculas da membrana celular e grupos funcionais dos polímeros. No entanto, este tipo de interacção não permite a transmissão adequada dos sinais provenientes do meio extracelular nem a adesão que as células requerem para sobreviver [32].

A adesão celular a um material artificial mediada por moléculas da MEC dá-se com a ligação destas às moléculas de adesão celular (MAC) existentes na membrana da célula. Neste caso, o material adsorve moléculas da MEC a partir do meio extracelular: por exemplo a partir do meio de cultura *in vitro* ou a partir dos fluídos corporais *in vivo* [32].

A adsorção apropriada e suficiente de moléculas da MEC e a sua acessibilidade para os receptores da membrana celular dependem de diversas características da superfície do material, entre as quais a (1) hidrofiliicidade/hidrofobicidade, (2) carga eléctrica, (3) topografia, (4) as propriedades mecânicas, (5) cristalinidade, (6) porosidade, (7) e solubilidade, entre outras propriedades, como a presença de determinados grupos funcionais [32, 33].

A adsorção óptima deverá ocorrer para valores moderados de hidrofobicidade, no entanto, vários materiais sintéticos são demasiado hidrofóbicos para uma boa promoção da adesão celular [32]. Nestes casos, a superfície do polímero pode ser tratada ou modificada para au-

mentar a sua hidroflicidade [27], ou então poderá ser realizada uma mistura com um polímero hidrofílico [19, 26].

Uma indicação da força da adesão de uma célula ao substrato é a sua forma ou comportamento. Por exemplo uma célula que se encontra fortemente aderida apresenta uma forma estendida espalhando-se ao longo de uma maior área. Pelo contrário, quando a adesão de uma célula é muito fraca, a sua forma apresenta-se arredondada. Neste último caso, a zona de contacto entre a célula e o substrato é muito pequena e como a maior parte das células necessita de adesão, normalmente não sobrevivem nestas condições [32].

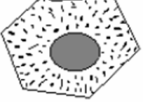
Cell behavior/ Cell spreading	Viability	Migration	Proliferation	Differentiation
Small 	↓	↓	↓	↓
Medium 	↑	↑	↑	↓
High 	↑	↓	↓	↑

Figura 1.6: Correlação entre a extensão da área de adesão e o comportamento celular subsequente [32].

Quando a força de adesão é intermédia, as células estão mais propícias à migração ou à proliferação e quando esta força é elevada, a área de contacto da célula com o substrato é grande, formando múltiplas adesões focais e tendendo a saltar a fase proliferativa e a entrar rapidamente em diferenciação [32].

1.4.2 Migração

Tais como outras funções fisiológicas das células como a proliferação e a diferenciação, também a migração está altamente dependente da adesão celular [34].

Existem diferentes modelos de migração celular dependendo do tipo de célula e do contexto em que ocorre a migração. Esta depende de diversos factores tais como a força de adesão, a organização do citoesqueleto celular, o tipo de substrato (incluindo ligantes e

outras células) e sinais mecânicos como a rigidez e a topografia. Por exemplo, as células imunitárias não possuem uma elevada organização do citoesqueleto e tendem a aderir pouco e a migrar rapidamente. Nos fibroblastos e em células precursoras de epitélio, por outro lado, o citoesqueleto e as adesões são estruturas elaboradas e a sua migração é considerada, no geral, relativamente lenta [35]. Apesar desta distinção, alguns tipos de células podem alternar entre estes modelos de migração dependendo do seu microambiente e do contexto em que está integrada [36].

O mecanismo de migração pode ser dividido, em geral, num conjunto de processos que incluem polarização, protrusão e adesão, translocação do corpo celular e retracção da parte traseira [35, 37].

A polaridade da célula implica que esta exiba diferenças funcionais e moleculares entre a frente (*leading edge*, parte mais próxima da direcção de migração) e a parte traseira (*retracting tail*, oposta à frente). No início da migração ocorre a polimerização de filamentos de actina na parte dianteira levando à formação de protrusões membranares e citoplasmáticas. As protrusões em forma de lamelas designam-se por *lamellipodia*, e as protrusões mais finas são designadas por *filopodia*. Em conjunto formam adesões imaturas à matriz extracelular e, enquanto algumas adesões são desfeitas, outras amadurecem fornecendo pontos aderentes durante a migração [37, 39]. Em células de migração rápida, a distinção entre estas etapas pode não ser tão óbvia [35].

No caso mais particular das células endoteliais, como estas se encontram no lúmen dos vasos sanguíneos e estão em contacto directo com o sangue, são expostas às tensões de cisalhamento exercidas pelo fluxo sanguíneo. Estas tensões influenciam o comportamento das células durante o processo de regeneração promovendo a formação de *lamellipodia* e a migração na direcção do fluxo sanguíneo [38, 40]. A resposta das células endoteliais a estas tensões envolve a dissociação dos contactos célula-célula e a activação de cascatas de sinalização, que conduzem à remodelação da actina do

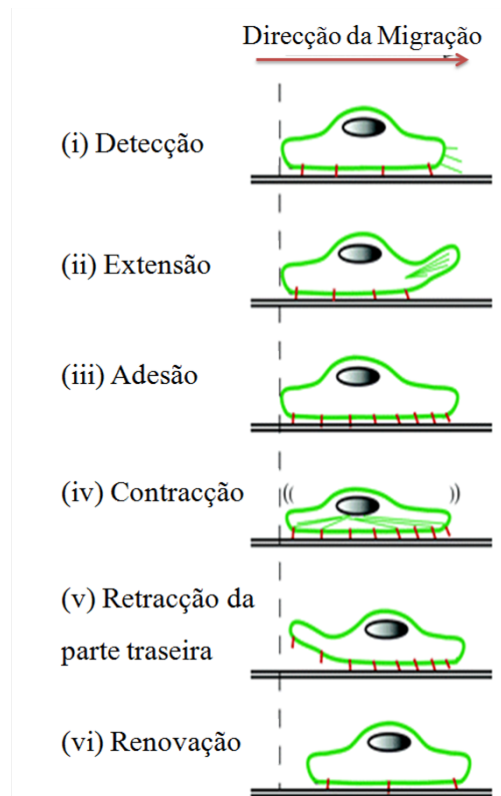


Figura 1.7: Etapas do processo de migração das células endoteliais. Imagem adaptada [38].

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

citoesqueleto das células e ao processo de polarização que inicia a migração (Fig 2.4) [38].

2

Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados na Produção de Matrizes, em especial na preparação das soluções poliméricas e no processo de electrofiação. De seguida, são apresentados os procedimentos e equipamentos utilizados para a sua Caracterização em termos de morfologia, perda de massa em função da reticulação e medição dos ângulos de contacto. Por último, são apresentadas as experiências de Cultura de Células nas matrizes para avaliação da adesão, proliferação e migração celular.

2.1 Produção de Matrizes

2.1.1 Preparação das Soluções Poliméricas

As soluções preparadas tiveram como objectivo a produção de matrizes de Polivinilpirrolidona (PVP), Policaprolactona (PCL) e matrizes com a mistura dos dois polímeros (PCL/PVP).

Na primeira etapa deste trabalho foi realizado um estudo da mistura dos polímeros Polivinilpirrolidona (PVP) e Policaprolactona (PCL) para electrofiação, sobre a qual existe pouca literatura. Para tal foram testadas soluções com diferentes solventes e concentrações com proporção 1:1 entre os polímeros. Para a produção de matrizes de PCL foram testados dois solventes diferentes para a mesma concentração e foi preparado apenas um tipo de solução com apenas PVP.

Os polímeros utilizados (Sigma-Aldrich) encontram-se listados na tabela 2.1 e os solventes nas tabela 2.2.

Tabela 2.1: Polímeros utilizados na produção de fibras por electrofiação.

Polímero	Fórmula Química	Massa Molecular
Policaprolactona	(C ₆ H ₁₀ O ₂) _n	70 000-90 000
Polivinilpirrolidona	(C ₆ H ₉ NO) _n	> 3 000 000

Tabela 2.2: Solventes utilizados na fabricação de fibras por electrofiação.

Solvente	Fórmula Química	Grau de Pureza (%)	Massa Molar (g.mol ⁻¹)
Ácido Acético	CH ₃ COOH	≥99.7	60.05
Clorofórmio	CHCl ₃	≥99	119.38
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	≥99.5	46.06
Metanol	CH ₃ OH	-	32.04

As soluções foram preparadas adicionando o solvente ao(s) polímero(s) e utilizando agitadores magnéticos para acelerar e homogeneizar o processo de dissolução. As soluções foram sempre electrofiadas no dia seguinte à sua preparação.

Para o estudo do processo de electrofiação foram preparadas as soluções listadas na tabela 2.3.

Tabela 2.3: Soluções preparadas para o estudo de electrofiação.

Polímeros	Solvente	Concentração (%)
PCL/PVP	100% Clorofórmio	6
		8
		10
		14
		20
	80% Clorofórmio, 20% Etanol 80% Clorofórmio, 20% Metanol Ácido Acético	14
PCL	100% Clorofórmio 100% Ácido Acético	20
PVP	75% Etanol, 25% H ₂ O	18

As concentrações são apresentadas em %p/p de acordo com a equação:

$$\text{Concentração}(\%p/p) = \frac{m_{polimero}}{m_{solvente} + m_{polimero}} \times 100 \quad (2.1)$$

Onde m_p é a massa de polímero e m_s a massa de solvente. Quando utilizados os dois polímeros numa solução, a massa de polímero m_p é a soma da massa de cada um.

As soluções utilizadas na produção de matrizes para os ensaios de Cultura Celular foram:

1. 20% PCL em Ácido Acético Glacial;
2. 18% PVP em Água destilada e Etanol (3:1);
3. 14% PVP/PCL (1:1) em Ácido Acético Glacial.

2.1.2 Equipamento e Processo de Electrofiação

Foram utilizadas dois tipos de montagens para o processo de electrofiação (A - figura 2.1(a) e B - figura 2.1(b)), ambos constituídos por uma bomba infusora, uma fonte de alta tensão e um colector.

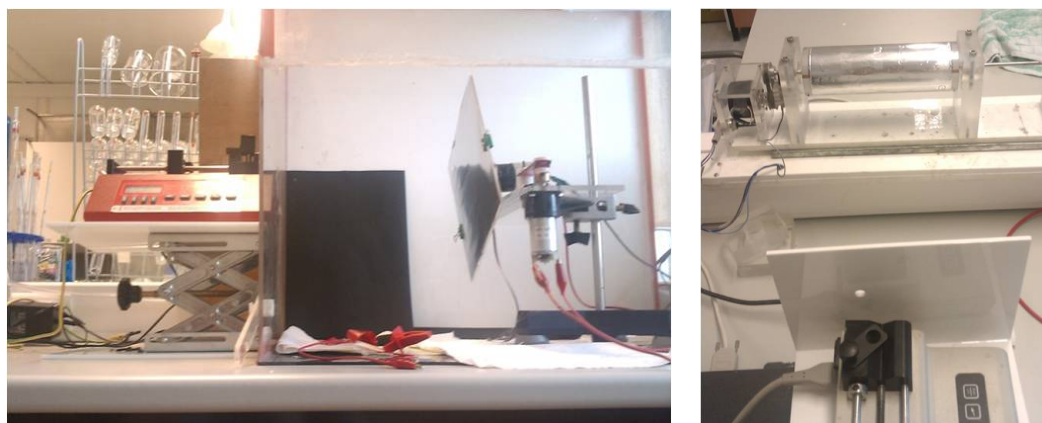
As duas montagens diferem unicamente no tipo de colector utilizado:

- A) Colector plano quadrado de dimensões 20 x 20 cm com movimento de translação e rotação;
- B) Colector cilíndrico com comprimento 22 cm e diâmetro 7 cm com movimento de translação e de rotação em torno do eixo horizontal. A velocidade de rotação pode ser controlada entre 250 e 4000 rotações/minuto (rpm).

A velocidade de rotação do colector cilíndrico permite obter matrizes com maior ou menor alinhamento das fibras.

Na produção das matrizes de PCL e PCL/PVP foi utilizado o colector cilíndrico com velocidade 250 rpm para matrizes desalinhas e 4000 rpm para matrizes alinhadas. As velocidades intermédias também foram utilizadas para obter alinhamentos intermédios.

Na produção de matrizes de PVP para cultura celular foi utilizado um colector plano quadrado. As fibras foram depositadas sobre lamelas redondas de vidro fixas ao colector em rotação e translação.



(a) Electrofiação com colector plano.

(b) Electrofiação com colector cilíndrico.

Figura 2.1: Equipamentos de Electrofiação com dois tipos de colector.

Nos processos de electrofiação, a seringa com a solução polimérica foi posicionada na bomba infusora, que pode ser configurada para ejectar diferentes fluxos de solução. Este valor pode ser variado entre 0 e 10 ml/h e pode ser controlado até à centésima de valor. A fonte de alta tensão foi ligada à agulha da seringa através de cabos com ponta de crocodilo e ambos os colectores encontravam-se ligados à terra.

Ao longo do aperfeiçoamento do processo de electrofiação, as fibras resultantes foram observadas no microscópio óptico Nikon Eclipse LV100.

2.1.3 Reticulação das Matrizes

As matrizes de PVP e PCL/PVP foram reticuladas com radiação Ultra-Violeta. As matrizes de PCL/PVP foram reticuladas com diferentes tempos de irradiação e serão designadas por **PCL/PVP x** onde x é o tempo de reticulação em minutos. Todas as amostras constituídas apenas por PVP foram reticuladas durante 8 horas. No forno utilizado, 8 minutos correspondem a uma dose de radiação UV de 1 J/m².

2.2 Caracterização das Matrizes

2.2.1 Morfologia das Fibras

As matrizes produzidas foram observadas por Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) para avaliação da sua morfologia. Este tipo de microscopia utiliza um feixe de electrões altamente energético para fazer o varrimento da amostra. O resultado da interacção deste feixe com os electrões da amostra é detectado, fornecendo informações sobre a sua topografia e até sobre a sua composição. Para este trabalho foram obtidas informações apenas da topologia das fibras recorrendo ao microscópio Zeiss Auriga.

Neste tipo de microscopia as amostras devem ser condutoras para impedir a acumulação de electrões na superfície. Para amostras não condutoras é habitualmente utilizado um revestimento de metal. As amostras constituídas por matrizes poliméricas são muito pouco condutoras, tendo sido revestidas com uma espessura de 8 nm de uma liga de Ouro (Au) e Paládio (Pd) (80%/20%).

As imagens obtidas permitiram a observação da superfície das fibras de PVP/PCL com diferentes tempos de reticulação após imersão em água e das fibras de PVP reticulado durante 8 horas. Permitiram ainda a quantificação do alinhamento de matrizes de PCL e de PVP/PCL dependendo da velocidade de rotação do colector e a medida dos diâmetros das fibras.

2.2.2 Perda de Massa

O ensaio de Perda de massa foi um dos métodos utilizados para caracterizar as consequências do processo de reticulação nas matrizes.

O PVP, não sendo reticulado, é solúvel em água, o que implica a sua dissolução quando em contacto com os fluidos corporais. Para impedir esta dissolução, o PVP foi reticulado através da exposição das matrizes electrofiadas a radiação UV. O estudo da reticulação das matrizes produzidas com a mistura de PVP/PCL seguiu o seguinte protocolo:

Foi produzida uma matriz a partir de uma solução de 14% PVP/PCL em Ácido Acético com parâmetros de electrofiação 12 kV de tensão aplicada, 1.0 ml/h de fluxo e 20 cm de distância num colector plano coberto com folha de alumínio em rotação e translacção. A matriz foi cortada em quadrados de aproximadamente 4 x 4 cm² e a cada amostra foi retirada a folha de alumínio.

As amostras foram irradiadas com UV durante diferentes tempos de reticulação que variaram entre 0 (amostras não reticuladas) e 150 minutos (2h30), com quatro amostras para cada tempo de reticulação.

As amostras foram pesadas numa balança de precisão e a sua massa foi registada como massa inicial (m_{inicial}).

Para a remoção do PVP não reticulado as amostras foram completamente imersas em água destilada e colocadas num agitador orbital durante aproximadamente 90 minutos.

Após esta lavagem foi retirado o excesso de água de cada amostra com papel absorvente e foram deixadas a secar ao ar até ao dia seguinte. Passada a noite as amostras encontravam-se completamente secas e foram novamente pesadas designando-se esta nova massa por massa seca (m_{seca}).

O cálculo da perda de massa a ser representada em percentagem sobre a massa inicial dá-se, então, a partir da equação 2.2

$$\% \text{ Perda de massa} = \frac{m_{\text{inicial}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.3 Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto entre uma gota de água e uma superfície fornece uma medida da sua hidroflicidade/hidrofobicidade. O ângulo é medido entre a recta tangente à superfície da gota e a recta sobre a superfície a testar. Diz-se que a superfície é hidrofóbica quando esta medida é superior a 90° e hidrofílica se for inferior. No primeiro caso, a forma da gota é mais redonda, predominando o efeito da tensão superficial. Já no segundo caso, a gota fica mais espalhada sobre a superfície havendo maior área de contacto.

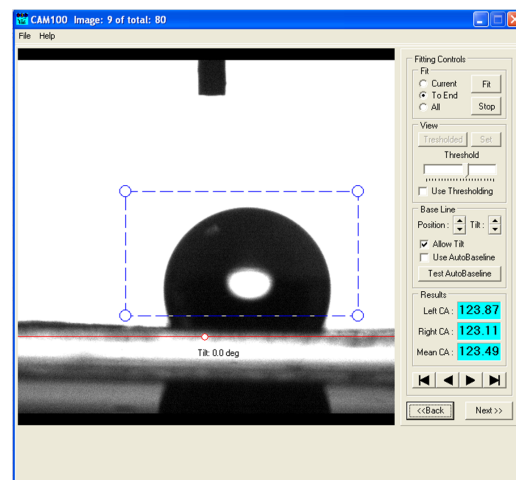
Para este estudo, todas as matrizes foram electrofiadas sobre lamelas quadradas ($22 \times 22 \text{ mm}^2$) com o objectivo de obter uma superfície plana. Durante o processo de electrofiação, as lamelas encontravam-se fixas ao colector cilíndrico com fita-cola de carbono dupla-face.

Os dados foram adquiridos através do *software* Cam 100 e da utilização do equipamento KSV CAM 101 (fig: 2.2(a)) do Departamento de Química da FCT-UNL.

As medições do ângulo de contacto são efectuadas a partir de imagens captadas pela câmara integrada no equipamento. A aplicação informática mede o ângulo entre a recta ajustada à superfície da amostra e a recta tangente à gota de água. No final, fornece os ângulos do lado esquerdo e direito da gota e da média dos dois para todas as imagens. Nos resultados será exibida apenas a média $\pm$ desvio padrão.



(a) KSV CAM 101



(b) Interface gráfica do *software* CAM 100.

Figura 2.2: Equipamento e *software* utilizados nas medições dos ângulos de contacto.

Para iniciar a medição, o utilizador pode seleccionar START manualmente ou pode utilizar um modo de funcionamento automático. Dependendo da amostra, pode ocorrer um efeito no qual a gota se deforma após a sua queda. Ao utilizar a opção automática do equipamento para iniciar a medição, foi necessário ignorar alguns valores iniciais medidos devidos a este efeito. Esta opção foi utilizada para as amostras de PCL/PVP, cujo ângulo de contacto variou com o tempo. Para as amostras de PCL, a medição foi inicializada manualmente, não ocorrendo grandes variações com o decorrer do tempo.

Foram realizadas medições em três zonas de cada amostra a partir das imagens adquiridas com uma frequência de 10 imagens/segundo durante pelo menos 5 segundos. Foi realizada ainda uma medição mais longa com frequência 2 imagens/s na matriz PCL/PVP 0 e 1 imagem/s nas matrizes PCL/PVP 5, 10, 30, e 60.

2.3 Cultura Celular

As experiências de cultura celular foram realizadas na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FC-UL) em colaboração com o Departamento de Biologia Animal utilizando células 3T3 [41, 42], fibroblastos de rato.

Para a análise da adesão e proliferação celular, as células foram marcadas com DAPI e Faloidina (Molecular Probes®) para observação dos núcleos e da actina do citoesqueleto, respectivamente. Foram também sujeitas a ensaios de viabilidade celular utilizando o reagente PrestoBlue™.

O DAPI e a Faloidina são ambos utilizados em imunofluorescência para a observação de componentes celulares. O DAPI liga-se fortemente a regiões ricas em ligações Adenina-Timina do DNA, permitindo a observação dos núcleos por microscopia de fluorescência. Ao absorver radiação Ultra-Violeta, o DAPI emite radiação visível na cor azul. A Faloidina é uma toxina que se liga à F-actina, um dos componentes do citoesqueleto celular. Foi utilizada Faloidina conjugada com o fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes®) que emite radiação visível a vermelho.

A marcação fluorescente foi sempre efectuada após a fixação das células, no entanto, também foi utilizado PrestoBlue™, reagente que fornece informações da viabilidade celular enquanto estas se encontram vivas, permitindo a continuação da cultura. Este reagente é baseado num composto azul, a Resazurina, que é reduzida pelo metabolismo das células vivas a Resorufina, um composto vermelho e altamente fluorescente. Assim, a conversão de Resazurina em Resorufina é proporcional ao número de células metabolicamente activas, podendo ser medida quantitativamente com leituras de absorvância ou fluorescência. Neste trabalho foram feitas medições de absorvância nos comprimentos de onda 601 nm (Resorufina) e 571 nm (Resazurina).

Para os estudos de migração celular, as células foram fotografadas vivas em *time-lapse* no microscópio Zeiss Lumar V12 durante 20 horas e 30 minutos.

Antes de qualquer cultura celular nas matrizes, foi realizado o protocolo relativo ao descongelamento das células e à sua sementeira em frascos de cultura T25 (Apêndice A) e também o protocolo de esterilização nas placas multi-poços (Apêndice B). Estes dois protocolos foram realizados em todas as quatro experiências de cultura celular mencionadas e também na cultura para o estudo de migração.

2.3.1 Adesão

Foram realizadas quatro experiências de cultura celular para avaliar o comportamento da linhagem de células 3T3 em termos de viabilidade e adesão às matrizes de PCL/PVP. Para termos comparativos, também foram avaliadas em matrizes de PCL e de PVP. Esta avaliação deu-se observando as células no microscópio de fluorescência Olympus BX 60 após marcação dos núcleos com DAPI. Na primeira experiência também foi utilizado Faloidina.

1º Ensaio

No 1º ensaio de adesão foram semeadas células 3T3 em matrizes de PCL/PVP com vários tempos de reticulação (0, 5, 10, 30 e 60 minutos) e em matrizes de PCL. Como controles positivos foram utilizadas lamelas de vidro, sabendo que estas células aderem bem a este tipo de substrato. Foram utilizadas três réplicas de cada amostra e três controles numa placa de 48 poços. Nesta placa foram também utilizados três poços cujas paredes foram barradas com cola de vácuo DowCorning para realização do teste de citotoxicidade, caso fosse necessária para os ensaios posteriores de migração.

A observação das células foi realizada por microscopia de fluorescência após a sua fixação e marcação dos núcleos e citoesqueleto.

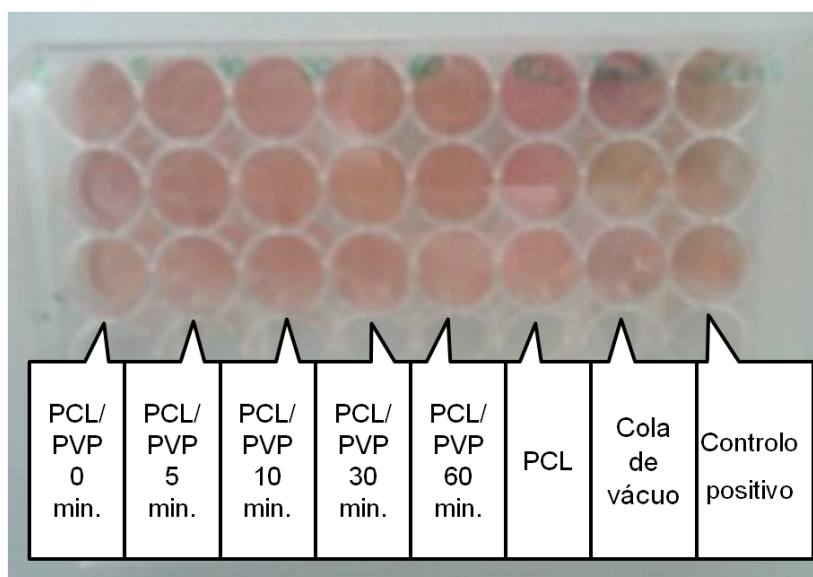


Figura 2.3: Placa de cultura multi-poços do 1^a ensaio de adesão.

As células foram descongeladas e semeadas num frasco de cultura T25 permanecendo dois dias em cultura (Apêndice A). As amostras e controlos foram esterilizados dentro das placas de poços antes da sementeira das células nas placas (Apêndice B). Após um dia em cultura, as células foram fixadas com formaldeído, permeabilizadas com Triton-X 100 e marcadas com Faloidina e DAPI (Apêndice C). Por último, as células foram vistas ao microscópio de fluorescência Olympus BX60.

2º Ensaio

Nesta cultura foram utilizados anéis cilíndricos de aço inoxidável com diâmetro 11 mm e altura 1 cm. Estes anéis foram colocados dentro dos poços de cultura por cima das matrizes, de modo a pressionar as margens da matriz contra o fundo do poço e impedir a passagem de células para fora do anel. Apesar do diâmetro externo do anel ser inferior ao diâmetro do poço de cultura, este é arredondado no fundo impedindo o contacto do anel com o fundo do poço. Para obter o encaixe pretendido, a superfície do anel foi desgastada até meio da sua altura.

Neste ensaio foram semeadas células em matrizes de PCL, PVP e PCL/PVP 0, 30 e 60. Foram também semeadas células em dois grupos de controlos com lamelas, um dos quais com os anéis de aço inoxidável (controlo positivo) e os outros três sem os anéis (controlos de citotoxicidade dos anéis). Para controlo negativo no ensaio de viabilidade com PrestoBlue foi adicionado meio sem células em três poços da placa.

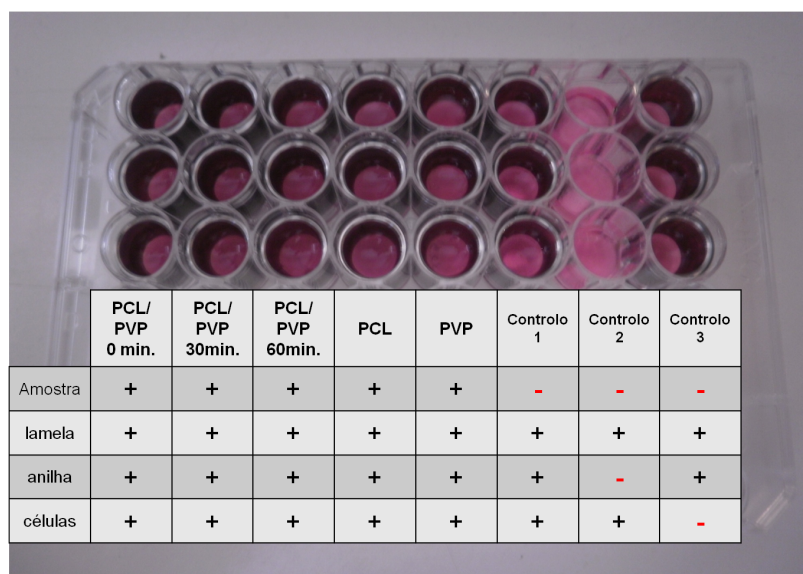


Figura 2.4: Placa de cultura multi-poços do 2^a ensaio de adesão.

Os protocolos seguidos de esterilização, cultura celular, fixação e marcação foram os mesmos da 1^a experiência (Apêndice C), com exceção da marcação com Faloidina. A marcação com DAPI foi seguida às três lavagens com PBS posteriores à permeabilização com Triton X-100.

3^a e 4^a Ensaios

Estas duas últimas experiências replicaram o 2^o ensaio de adesão, não tendo sido apenas utilizados os anéis de aço inoxidável.

Foi realizada cultura sobre amostras de PCL, PCL/PVP 0, PCL/PVP 30, PCL/PVP 60 e PVP e sobre lamelas (controlos positivos). Na 3^a experiência foram utilizadas três réplicas de cada amostra e na 4^a foram utilizadas quatro réplicas.

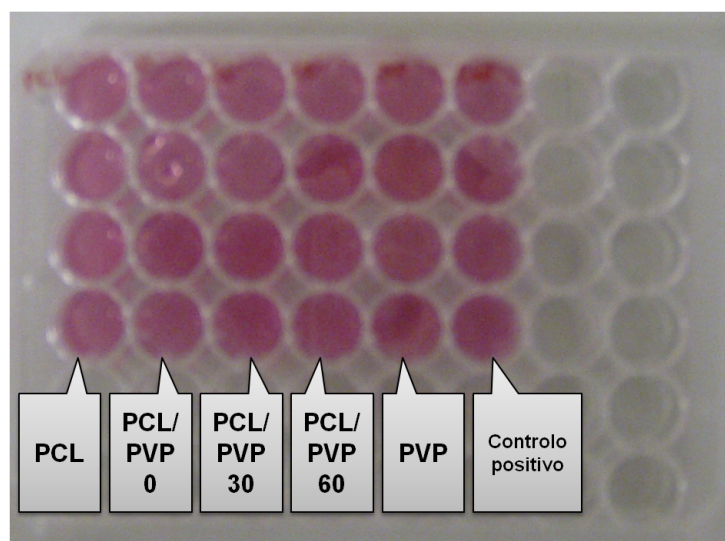


Figura 2.5: Placa de cultura multi-poços utilizada no 4^a ensaio de adesão.

Em ambas as experiências, as células mantiveram-se em cultura sobre as amostras durante um dia, após o qual foram fixadas, marcadas com DAPI e observadas por microscopia de fluorescência.

2.3.2 Proliferação

A proliferação de células 3T3 nas matrizes foi avaliada no 1^o Ensaio de Cultura Celular, recorrendo à fixação das células e marcação com DAPI e Faloidina no 3^o dia de cultura. As imagens de fluorescência obtidas foram comparadas com os resultados da 1^a experiência de adesão, na qual as células foram fixadas após um dia. Ocorrendo proliferação celular nas matrizes, serão observadas mais células quanto maior o tempo de cultura.

2.3.3 Viabilidade

Foram realizados estudos de viabilidade com o reagente PrestoBlue™ no 2^o, 3^o e 4^o ensaio de cultura celular. O PrestoBlue™ é adicionado ao meio das células enquanto estão em cultura numa proporção de 1:10. Após adição do reagente, as células são colocadas novamente na estufa e incubadas durante 1-2h. Após este tempo, o meio de cultura (que contém reagente) é retirado para uma placa de 96 poços e sujeito a leituras de absorvância. Os três ensaios de viabilidade diferiram apenas no tempo de incubação do reagente nas amostras. No 2^o ensaio de cultura, o reagente foi incubado na estufa durante 1h, no 3^o ensaio durante 1h30 e no 4^o ensaio durante 2h. Este protocolo foi alterado devido à necessidade de obter valores de absorvância que facilitassem a comparação dos resultados obtidos entre as amostras.

2.3.4 Migração

Produção das amostras

Para o ensaio de Migração foi produzida uma matriz alinhada de PCL. Esta matriz foi produzida por electrofiação da solução de 20% PCL em Ácido Acético sobre lamelas de vidro redondas ($d=12$ mm) durante 10 minutos. As lamelas foram fixadas com fita-cola dupla face no colector cilíndrico, colocado posteriormente em rotação com a velocidade máxima de 4000 rpm.

Após a deposição das fibras, foi colocada solução à volta da lamela com o objectivo de impedir a separação das fibras da lamela durante a cultura celular. Por último, as amostras foram colocadas no exsiccador durante a noite.

Produção do filme

Foi colocada uma amostra numa caixa de petri esterilizada de acordo com o protocolo descrito no Apêndice B.

A cultura celular seguiu também os protocolos de descongelamento das células 3T3, sementeira num frasco T25 e sementeira nas amostras descritos nos Apêndices A e B.

Após um dia em cultura, a caixa de petri foi colocada numa estufa integrada no microscópio Zeiss Lumar V12, previamente aquecida a 37° sem controlo dos níveis de Dióxido de Carbono. Deste modo, para manter o pH fisiológico foi adicionado HEPES ao meio de cultura em concentração 20 mM. O meio de cultura contém Bicarbonato de Sódio como componente primário do sistema de tamponagem, no entanto este necessita de uma atmosfera rica em Dióxido de Carbono (5-10%) para manter os níveis de pH. O HEPES é um tampão que possui a capacidade de manter estes níveis de pH sem ser influenciado por variações na percentagem de Dióxido de Carbono. Da amostra foi escolhido um campo visual com densidade de células considerada adequada.

As células foram fotografadas a cada seis minutos durante 20 horas e 30 minutos para produção de um filme em *time-lapse*.

Para a análise do filme obtido, recorreu-se ao programa Imagej e ao *plugin* mTrackJ [43], tendo-se seguido o percurso individual de sete células.

3

Apresentação e Discussão de Resultados

A apresentação dos resultados encontra-se dividida em três secções principais: Produção das matrizes, Caracterização e desempenho na Cultura Celular.

Na primeira foi realizado o estudo da influência dos parâmetros da solução e dos parâmetros da electrofiação na produção de matrizes de PCL/PVP e relatado o efeito do solvente na produção de matrizes de PCL. No fim desta secção são apresentadas as soluções e parâmetros escolhidos na produção dos três tipos de matrizes: PCL, PVP e PCL/PVP.

De seguida, as matrizes são caracterizadas de acordo com a sua morfologia e grau de alinhamento, perda de massa em função da reticulação e hidrofilicidade/hidrofobicidade.

Por último, são comparados os comportamentos de células 3T3 nas diferentes matrizes e nos controlos (lamelas de vidro). Os resultados estão divididos de acordo com o comportamento a estudar, sendo discutidos os resultados de diferentes métodos utilizados. Será avaliada, em primeiro lugar, a adesão, seguida da proliferação, viabilidade e migração.

3.1 Produção das Matrizes

Foram preparadas soluções poliméricas com o objectivo de produzir matrizes de PCL, PVP e PCL/PVP. Foi realizado o estudo de produção de matrizes de PCL/PVP testando soluções com diferentes concentrações e solventes e diferentes parâmetros de electrofiação. As matrizes só de PCL e só de PVP foram produzidas utilizando soluções e parâmetros de electrofiação anteriormente estudados no Grupo de Engenharia de Tecidos, tendo-se apenas comparado dois tipos de solvente na produção de matrizes de PCL.

3.1.1 Propriedades das Soluções Poliméricas

A mistura de PCL/PVP foi inicialmente realizada dissolvendo os polímeros em solvente constituído por 100% Clorofórmio, bom solvente para ambos os polímeros individualmente.

Esta mistura de PCL/PVP apresenta um aspecto baço em vez de límpido tal como se obtém ao dissolver os polímeros individualmente em Clorofórmio. O aspecto baço mantém-se quer os polímeros sejam dissolvidos em simultâneo, quer dissolvendo o PVP numa solução de PCL ou dissolvendo PCL numa solução de PVP e também ao misturar as soluções de PVP e PCL preparadas individualmente. Estipulou-se que este aspecto poderia ser indicativo da existência de alguma separação de fases entre os polímeros, o que poderia conduzir a uma distribuição heterogénea do PVP e do PCL ao longo das fibras produzidas.

A solução utilizada na produção das matrizes foi escolhida avaliando a deposição no colector durante o processo de electrofiação e avaliando a morfologia das fibras no microscópio óptico, tendo em conta a dimensão dos diâmetros e a frequência de defeitos. Tanto as propriedades da solução utilizada como os parâmetros de electrofiação influenciam estes resultados.

Concentração

Foram electrofiadas soluções com diferentes concentrações da mistura de polímeros PCL/PVP em solvente 100% Clorofórmio e 100% Ácido Acético.

A mistura de PCL/PVP em Clorofórmio possui a particularidade de resultar numa deposição muito localizada durante o processo de electrofiação. Esta característica impede a produção de uma membrana homogénea e de grandes dimensões já que não é dispersa ao longo do colector. O aumento da concentração da mistura de PCL/PVP em Clorofórmio resultou em deposições mais dispersas e uniformes, em especial a concentração de 14% comparativamente às de 8% e 10% (figura 3.1). Com concentração 20% PCL/PVP, já não foi possível electrofiar a solução devido à sua elevada viscosidade.

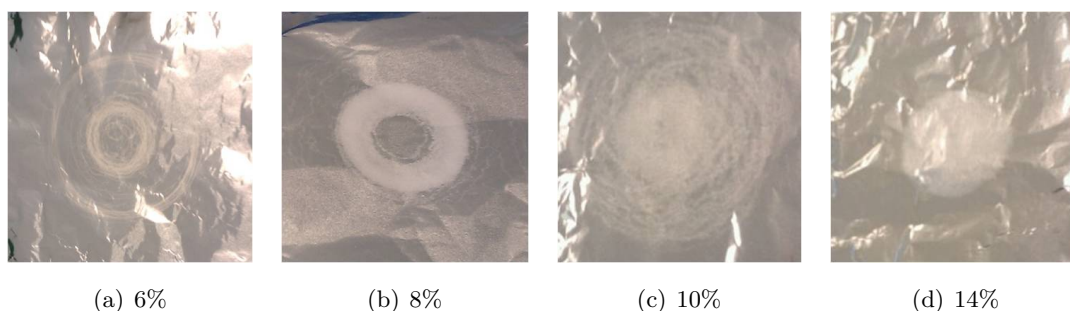


Figura 3.1: Efeito na dispersão da deposição no colector com a variação da concentração de PCL/PVP em Clorofórmio.

Para o solvente constituído por 100% Ácido Acético, uma concentração de 10% de

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

PCL/PVP resulta em fibras com defeitos designados por contas ou "beads". Estes defeitos são devidos ao efeito da tensão superficial. Este efeito desaparece aumentando a concentração para 14% (figura 3.2).

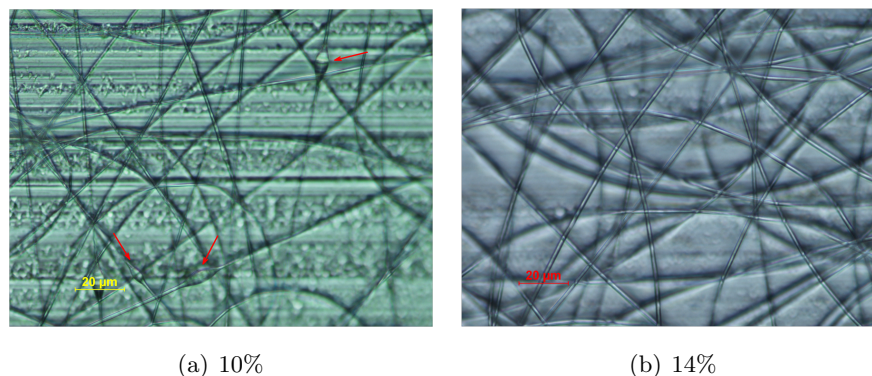


Figura 3.2: Efeito na morfologia das fibras com a variação da concentração (em %p/p) de PCL/PVP em Ácido Acético.

Por último, para todas as soluções em geral verificou-se na morfologia das fibras um aumento de diâmetro com o aumento da concentração (figura 3.3).

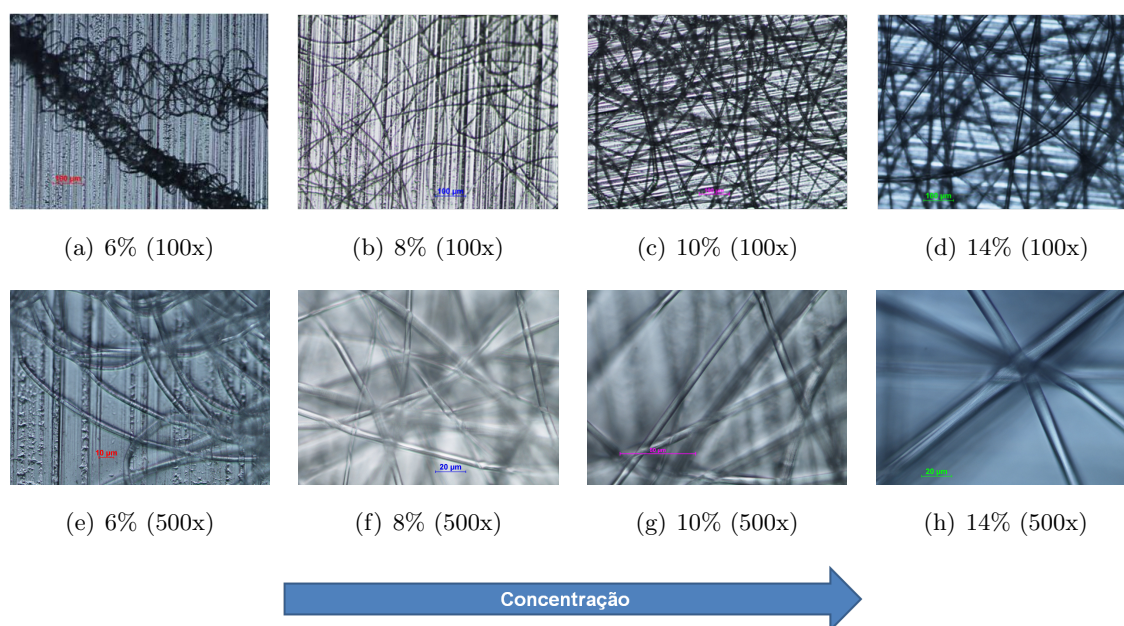


Figura 3.3: Efeito no diâmetro das fibras em função da concentração (em %p/p) de PCL/PVP em Clorofórmio.

Solvente

Foi também estudado o efeito de diferentes solventes na mistura de PCL/PVP. Entre vários destacaram-se os seguintes:

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

- 100% Clorofórmio;
- 100% Ácido Acético;
- 20% Etanol e 80% Clorofórmio;
- 20% Metanol e 80% Clorofórmio;

Os diferentes solventes tiveram efeito no aspecto da solução, no processo de electrofiação e na morfologia das fibras produzidas.

O aspecto da mistura de PCL/PVP é baço e esbranquiçado em todas as soluções, excepto na solução com solvente 20% Metanol e 80% Clorofórmio que apresenta um aspecto muito mais límpido e transparente. No entanto, a utilização deste solvente resultou em jactos de solução ejectados durante o processo de electrofiação, causando grandes variações nos diâmetros das fibras e até regiões da deposição com grandes quantidades de solução e sem fibras. Este efeito ocorreu para várias conjugações dos diferentes parâmetros de electrofiação.

Como mencionado anteriormente, a utilização de solvente 100% Clorofórmio resulta em deposições localizadas e com tendência a acumular em determinadas zonas do colector durante deposições longas. Verificou-se que a utilização do solvente Ácido Acético permite uma dispersão da deposição ao longo de todo o colector, possibilitando a obtenção de membranas maiores e mais homogêneas. Verificou-se também este efeito utilizando o solvente 20% Etanol e 80% Clorofórmio, mas apenas para distâncias da agulha ao colector superiores a 30 cm (figura 3.4).

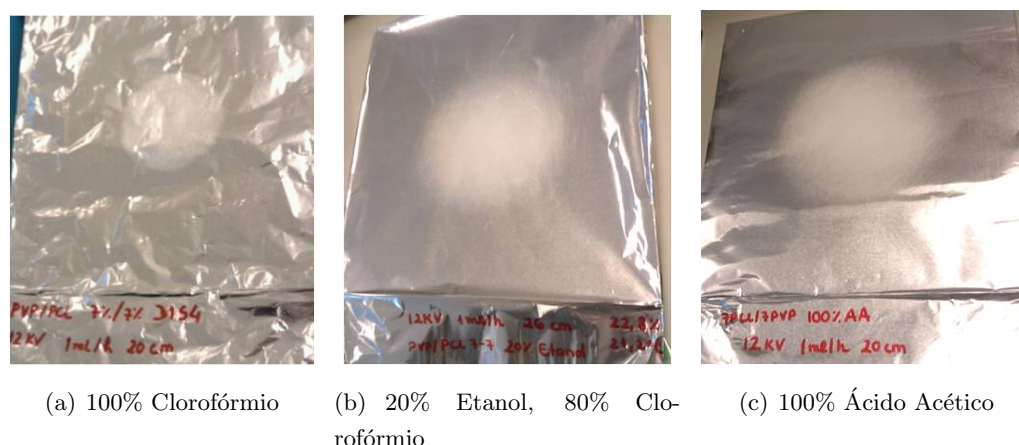


Figura 3.4: Efeito na deposição em função do Solvente utilizado para concentrações de 14% PCL/PVP.

Quanto à morfologia das fibras, foram obtidas fibras sem defeitos para todos os solventes utilizados, excepto para o 20% Metanol, 80% Clorofórmio acima mencionado. Foi possível

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

observar fibras com diâmetros bastante mais elevados para o solvente 100% Clorofórmio comparativamente a qualquer um dos outros solventes (figura 3.5).

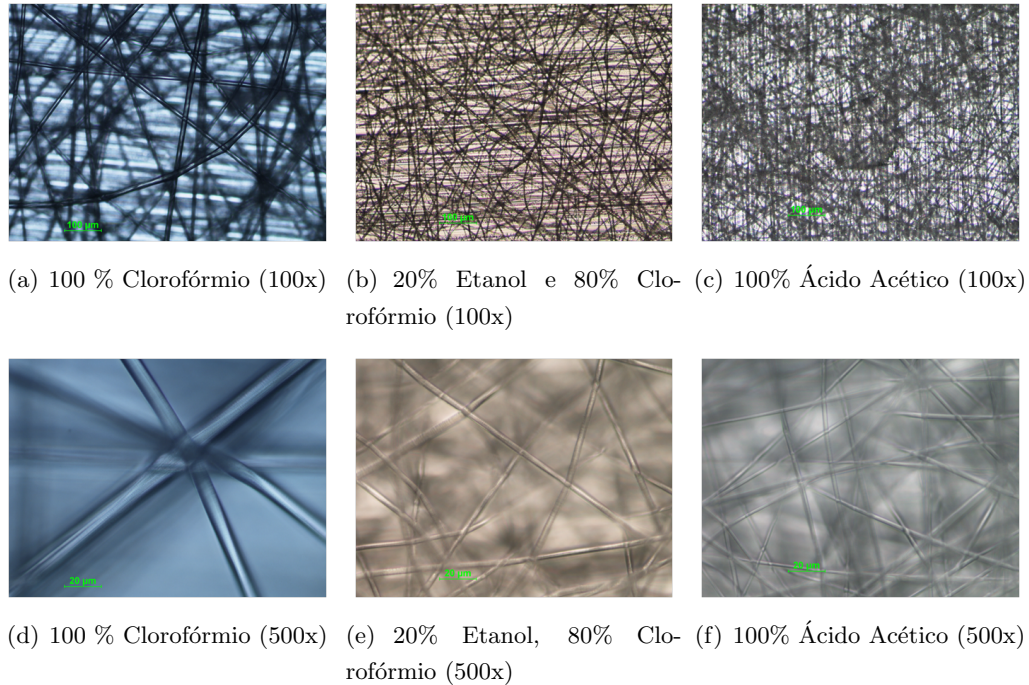


Figura 3.5: Efeito na morfologia das fibras obtidas por electrofiação de soluções com diferentes solventes.

Esta diferença tem origem nas propriedades das soluções. Por exemplo, utilizando o solvente 20% Etanol, 80% Clorofórmio, a solução torna-se menos viscosa, resistindo menos ao estiramento e produzindo fibras mais finas. Já no caso do solvente Ácido Acético, as fibras mais finas são provavelmente causadas pelo aumento da condutividade da solução comparativamente aos outros solventes, em vez de por diminuição da viscosidade. Possivelmente também devido à baixa viscosidade da solução com 20% Etanol, 80% clorofórmio, a formação de gota na ponta da agulha impede a realização de electrofiação longas e, portanto, a fabricação de membranas espessas.

Também na solução contendo apenas PCL foi verificada a influência do solvente ao serem comparados em soluções de 20% PCL com solvente 100% Clorofórmio ou 100% Ácido Acético. Os diâmetros das fibras produzidas a partir da solução com Ácido Acético são menores e semelhantes aos diâmetros produzidos com a mistura PCL/PVP em Ácido Acético.

Por fim, foi escolhido o solvente Ácido Acético para a produção das matrizes de PCL/PVP com concentração 14% para caracterização e cultura celular. Para as matrizes de PCL também foi escolhido o Ácido Acético como solvente.

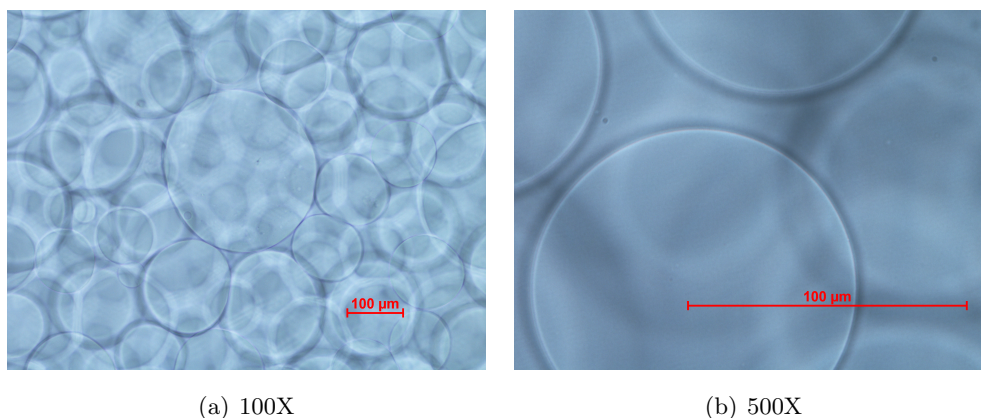


Figura 3.6: Solução de 14% PCL/PVP em Ácido Acético vista no microscópio óptico com ampliações 100X (a) e 500X (b).

A solução de PCL/PVP escolhida vista ao microscópio óptico revela partículas esféricas de diâmetros na ordem dos $100\ \mu\text{m}$ (figura 3.6). Este aspecto parece ser indicativo de que existe realmente uma separação de fases entre os polímeros, não sendo possível identificar qual dos dois representa a fase dispersa ou a fase contínua.

3.1.2 Parâmetros de Electrofiação

Dos parâmetros de Electrofiação foram variados a Tensão aplicada, o Fluxo, a Distância da agulha ao colector e a Velocidade do colector cilíndrico. As observações com microscópio óptico mostraram que, dentro dos valores testados, o Fluxo e a Velocidade foram os parâmetros que mais influenciaram a morfologia das fibras depositadas. A Tensão aplicada e a Distância da agulha ao colector produziram maiores diferenças na deposição das fibras ao longo do colector.

Tensão

Verificou-se que a tensão aplicada produz maior efeito no processo de electrofiação do que propriamente na morfologia das fibras produzidas. Para soluções pouco viscosas, o aumento da tensão evita a formação de gota na ponta da agulha que pode eventualmente ser ejectada para o colector, produzindo defeitos de grandes dimensões na matriz. Por outro lado, tensões demasiado elevadas provocam uma grande instabilidade do jacto que pode conduzir a uma deposição pouco uniforme.

Nas observações efectuadas com o microscópio óptico não foram detectadas diferenças significativas na morfologia das fibras obtidas com os vários valores de tensão aplicada (figura 3.7).

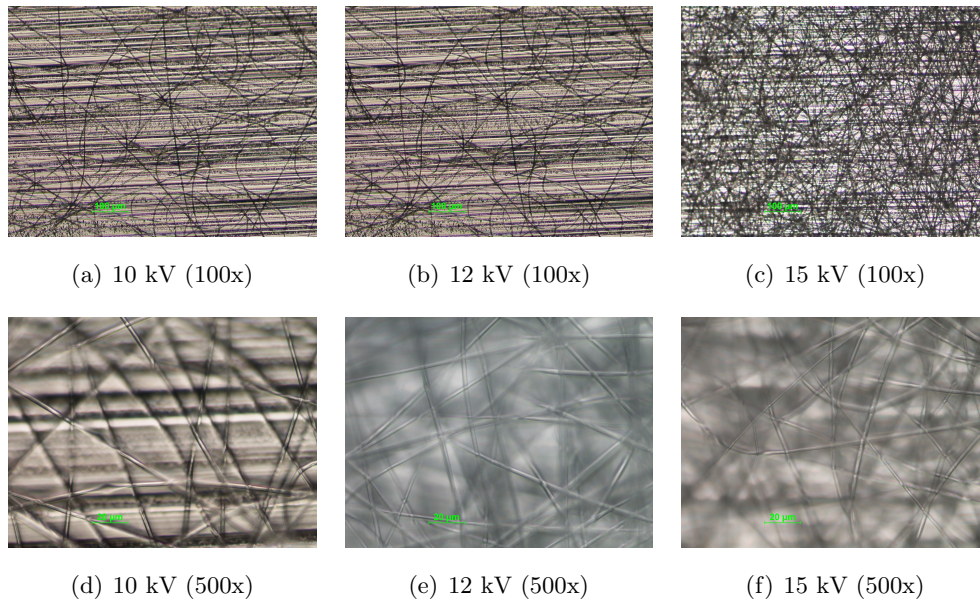


Figura 3.7: Morfologia das fibras depositadas em função da Tensão aplicada (kV) da solução de 14% PVP/PCL em Ácido Acético.

Fluxo

Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas com a variação do fluxo para a solução de 14% PCL/PVP em Ácido Acético, escolhida para utilizar neste trabalho, foi possível verificá-lo, por exemplo, para a mesma solução com concentrações 10% e 16% PCL/PVP.

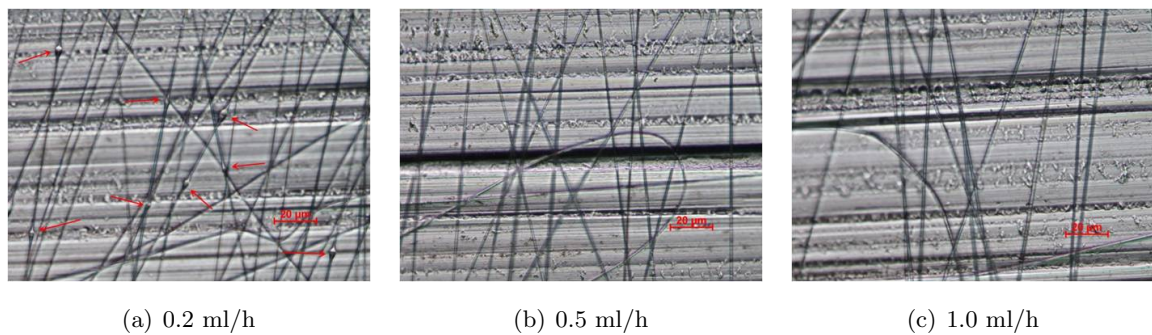


Figura 3.8: Morfologia das fibras depositadas em função do Fluxo (ml/h) numa solução de 10% PVP/PCL em Ácido Acético com aplicação 500X.

Por exemplo para a concentração de 10%, o aumento do fluxo diminui significativamente a frequência de defeitos (figura 3.8).

Aumentando a concentração para 16%, observa-se um grande aumento na dimensão dos diâmetros das fibras com o aumento do fluxo (figura 3.9). Para concentrações inferiores a 16%, não foram detectadas variações significativas nos diâmetros das fibras através da ob-

servação com microscópio óptico.

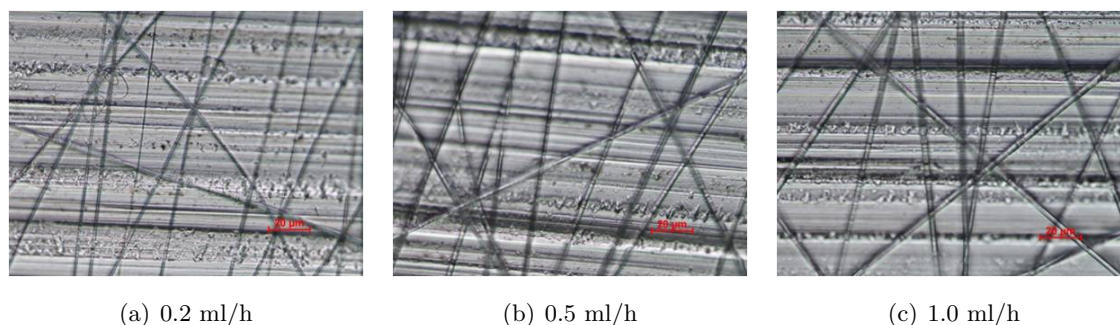


Figura 3.9: Morfologia das fibras depositadas em função do Fluxo (ml/h) numa solução de 16% PVP/PCL em Ácido Acético com tensão aplicada 12 kV e distância 20 cm (500X).

Para a solução utilizada escolheu-se um fluxo de 1.0 ml/h que permite uma deposição rápida sem acumulação de solução na ponta da agulha e cujas fibras produzidas não apresentam defeitos. Para algumas soluções, também se verificou que uma diminuição do caudal ajuda a evitar a formação de gota na ponta da agulha.

Distância

A distância da agulha ao colector é o parâmetro para o qual é mais difícil encontrar uma relação de proporcionalidade entre a sua variação e os resultados produzidos na morfologia das fibras.

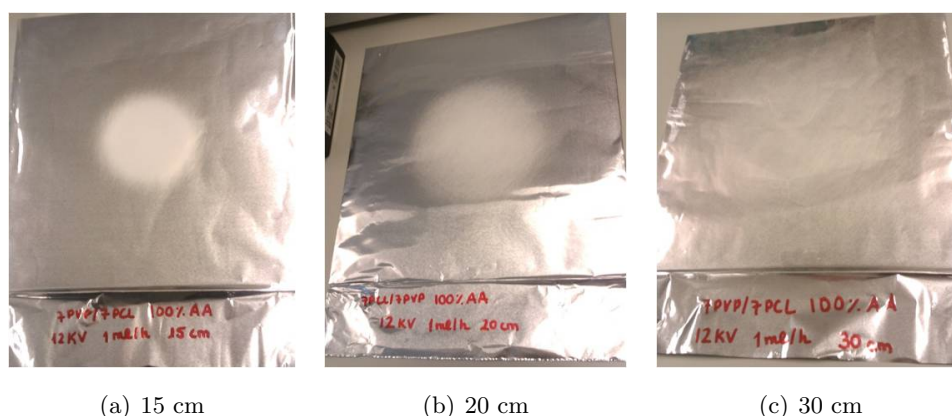


Figura 3.10: Efeito na deposição das fibras produzidas por electrofiação da solução de 14% PCL/PVP em Ácido Acético com tensão aplicada 12 kV e fluxo 1,0 ml/h.

Distâncias mais pequenas aparentam produzir variações maiores nos diâmetros das fibras produzidas, especialmente para as soluções com solvente Clorofórmio. No geral, a

distância foi escolhida de acordo com o resultado da deposição das fibras otimizando a dispersão da deposição ao longo do colector. Para a solução de PCL/PVP escolhida, optou-se por uma distância de 20 cm que permite um preenchimento do colector em deposições longas e com menor desperdício de fibras depositadas fora deste (figura 3.10).

Efeito do colector

A rotação do colector cilíndrico causa o estiramento das fibras forçando o seu alinhamento na direcção da rotação (figura 3.11). Este estiramento à qual as fibras são submetidas produz efeito não só no seu alinhamento, mas também nas dimensões dos seus diâmetros. Pode verificar-se, a partir das imagens obtidas por SEM, que tanto as matrizes de PCL como as matrizes de PCL/PVP possuem diâmetros inferiores quando são alinhadas comparativamente às mesmas matrizes desalinhadas, já que foram submetidas a um estiramento extra causado pela velocidade de rotação do colector.

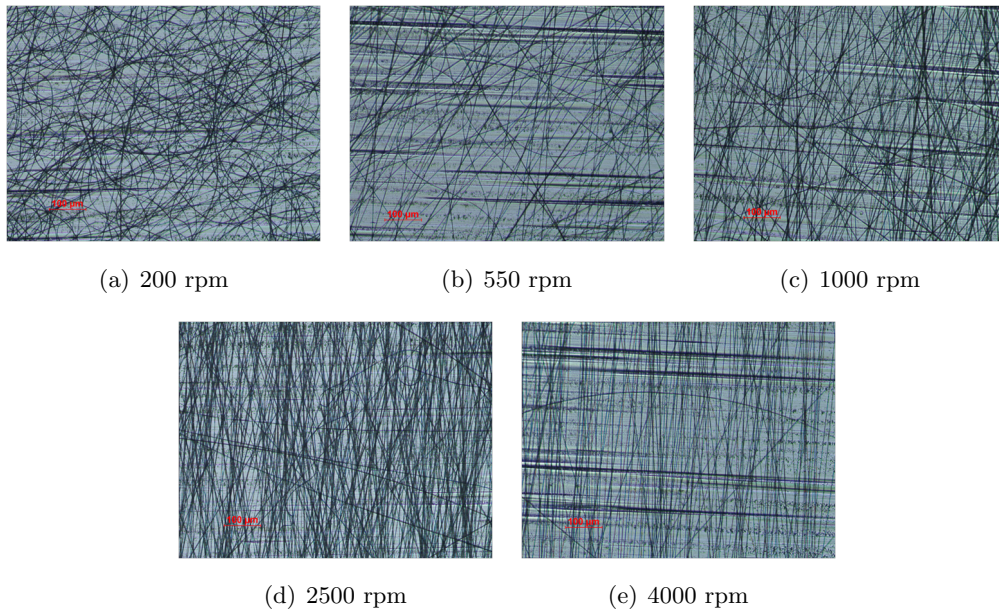


Figura 3.11: Efeito no alinhamento das fibras depositadas com a velocidade do colector.

Os parâmetros escolhidos para a produção das matrizes de PCL/PVP foram: tensão aplicada de 12 kV, fluxo de 1,0 ml/h e distância da agulha ao colector de 20 cm.

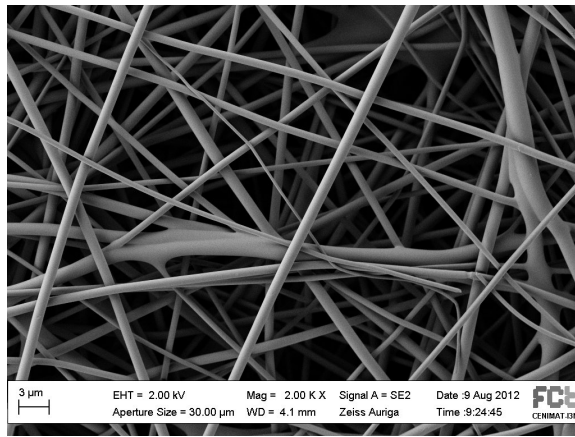
3.2 Caracterização das Matrizes

3.2.1 Morfologia

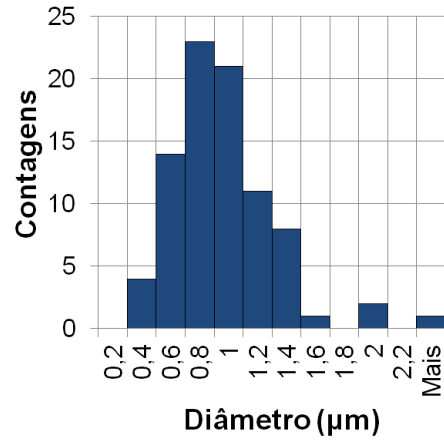
Matriz de PVP

As fibras de PVP após produção e reticulação apresentam um diâmetro médio calculado de $0.86 \pm 0.4 \mu\text{m}$. Após a imersão em água e secagem, as fibras apresentam superfície

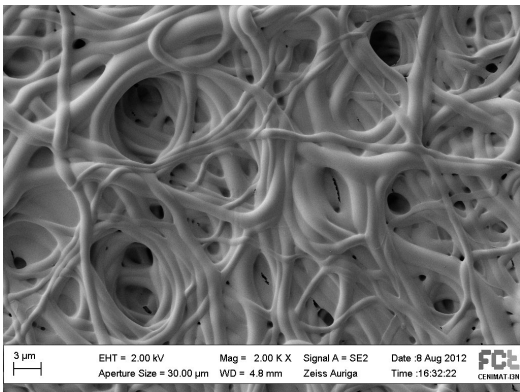
lisa e aspecto fundido. Neste caso não se considera razoável falar de diâmetros das fibras (figura 3.12).



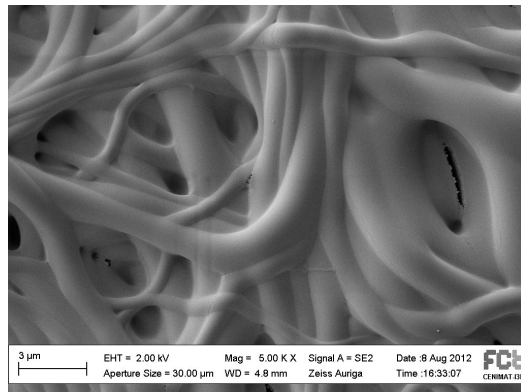
(a) Matriz de PVP desalinhada



(b) Distribuição dos diâmetros na matriz de PVP



(c) PVP (ampliação 2000X)



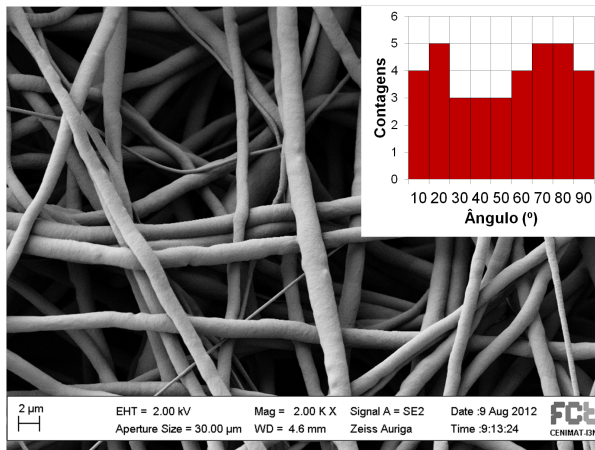
(d) PVP (ampliação 3000X)

Figura 3.12: Aspecto das fibras de PVP reticuladas durante 8h antes (a) e após imersão em água (c).

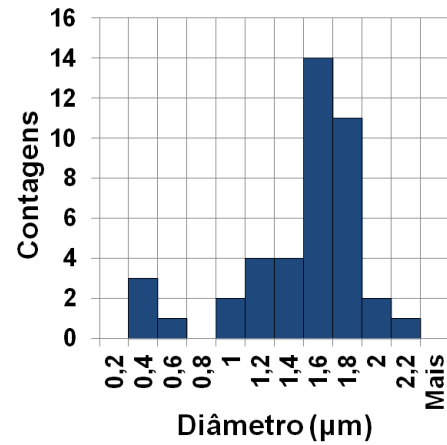
Matriz de PCL

A matriz desalinhada de PCL possui fibras com diâmetro médio calculado de $1.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$. A velocidade de rotação do colectador produz uma diminuição no diâmetro médio das fibras para $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$, praticamente metade do diâmetro das fibras desalinhas. Este estiramento também produz fibras com distribuição de diâmetros mais homogênea (figura 3.13).

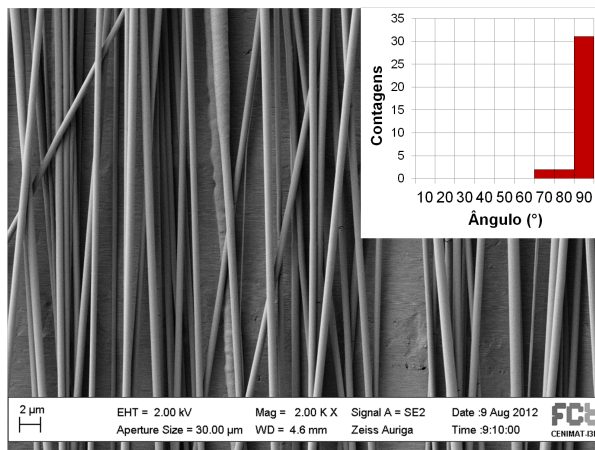
O alinhamento foi quantificado através da medição do menor ângulo de cada fibra com o eixo horizontal. As fibras possuem elevado alinhamento na direcção vertical, com todos os ângulos calculados com valores entre $60-90^\circ$ e, em grande maioria, entre $80-90^\circ$ (figura 3.13).



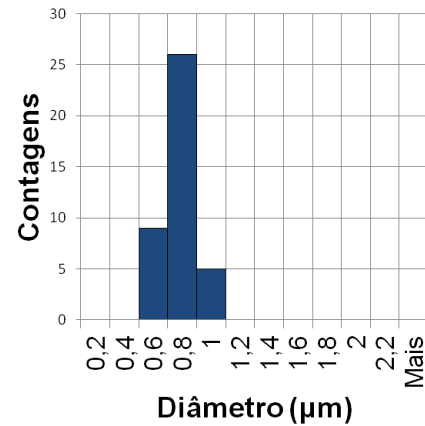
(a) Matriz de PCL desalinhada



(b) Distribuição dos diâmetros das fibras desalinhadas de PCL



(c) Matriz de PCL alinhada



(d) Distribuição dos diâmetros das fibras alinhadas de PCL

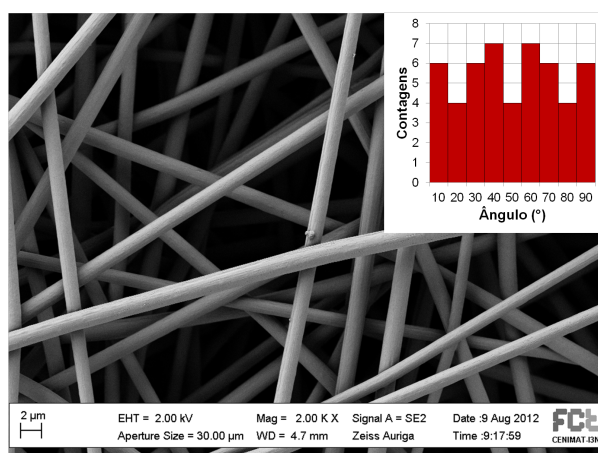
Figura 3.13: Matrizes desalinhada (250 rpm) e alinhada (4000 rpm) de PCL e respectivas distribuições dos ângulos e diâmetros.

Matriz de PCL/PVP

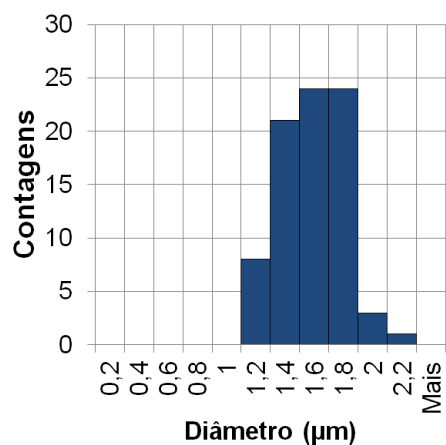
Os diâmetros médios calculados para as fibras de PCL/PVP desalinhadas, semi-alinhadas (1000 rpm) e alinhadas foram $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $1.2 \pm 0.4 \mu\text{m}$ e $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$, respectivamente (figura 3.14).

Desta análise das imagens de SEM, conclui-se que velocidades maiores de rotação do colector, produzem maior grau de alinhamento e fibras com diâmetros inferiores. De notar que as fibras de PCL/PVP alinhadas encontram-se pouco esticadas, podendo aparentar um alinhamento inferior.

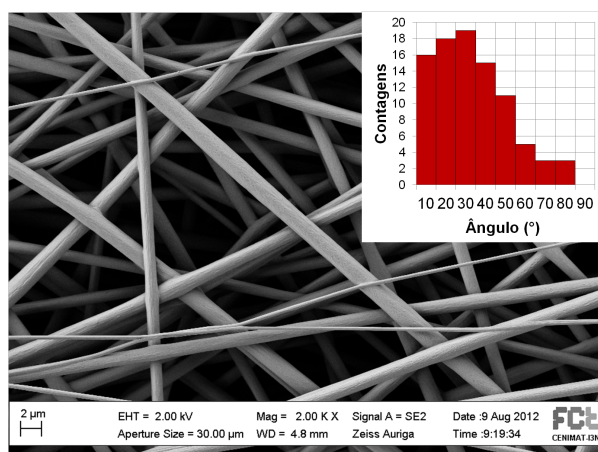
CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



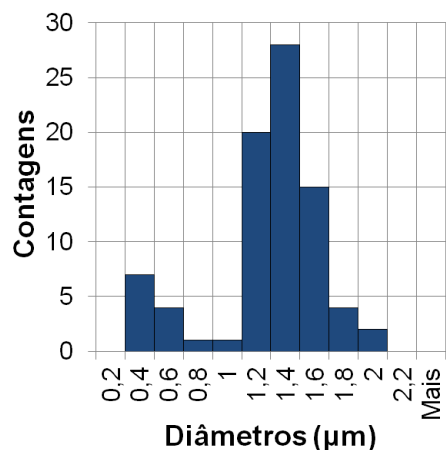
(a) Matriz de PCL/PVP desalinhada



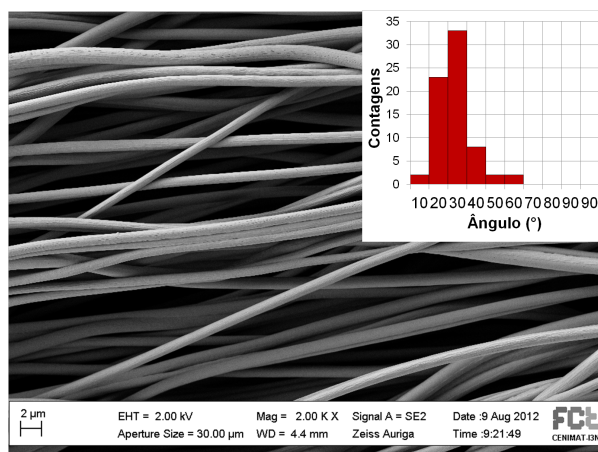
(b) Distribuição dos diâmetros das fibras desalinhadas de PCL/PVP



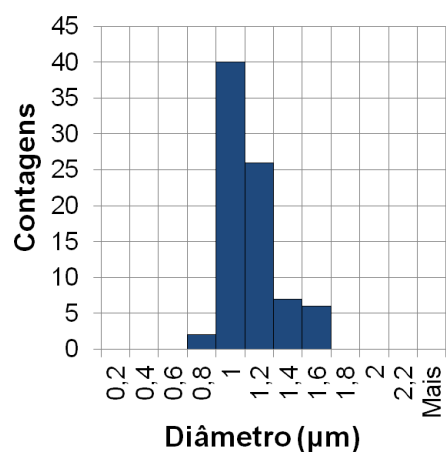
(c) Matriz de PCL/PVP semi-alinhada



(d) Distribuição dos diâmetros das fibras semi-alinhadas de PCL/PVP



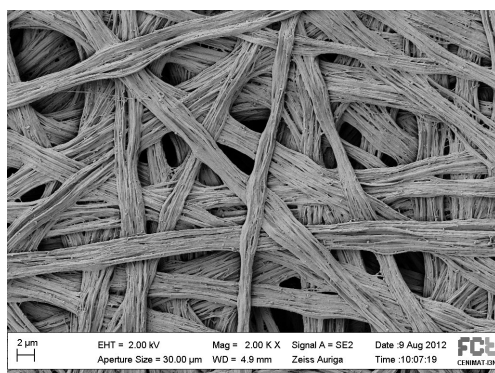
(e) Matriz de PCL/PVP alinhada



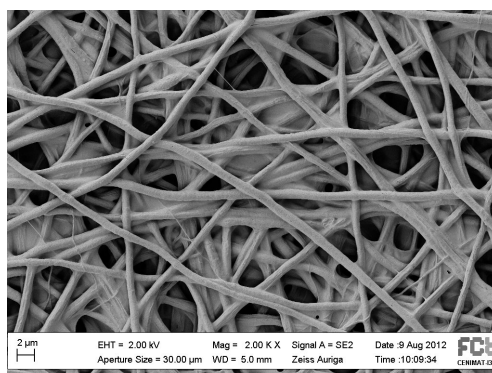
(f) Distribuição dos diâmetros das fibras alinhadas de PCL/PVP

Figura 3.14: Imagens de SEM de matrizes de PCL/PVP pós-produção com respectivos histogramas de distribuição dos diâmetros das fibras.

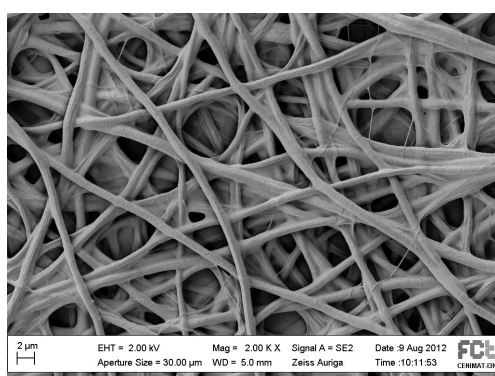
CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS



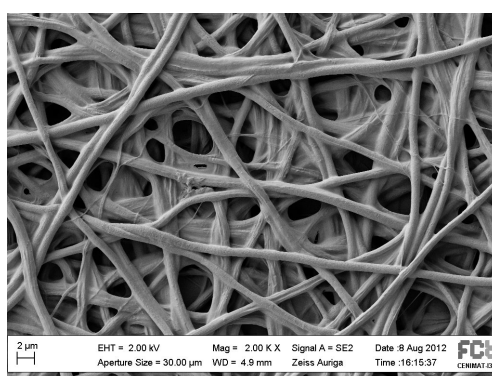
(a) PCL/PVP 0



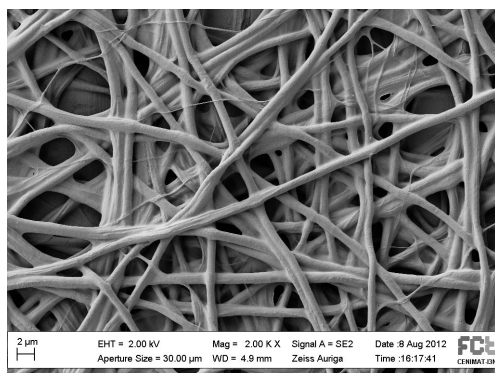
(b) PCL/PVP 5



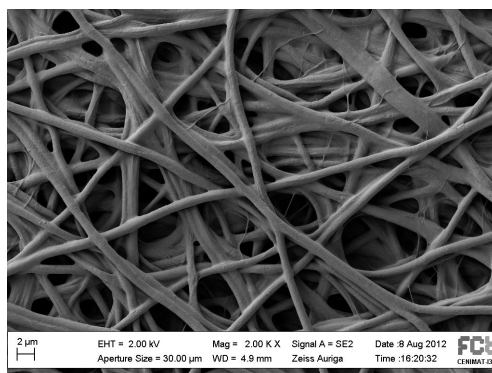
(c) PCL/PVP 10



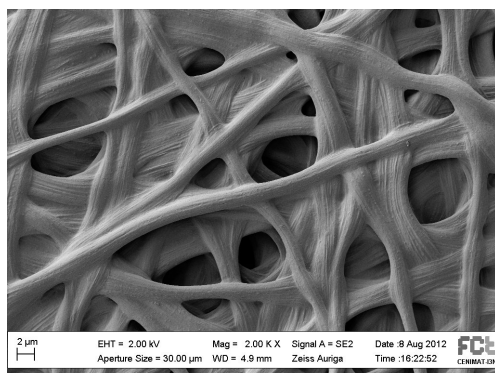
(d) PCL/PVP 15



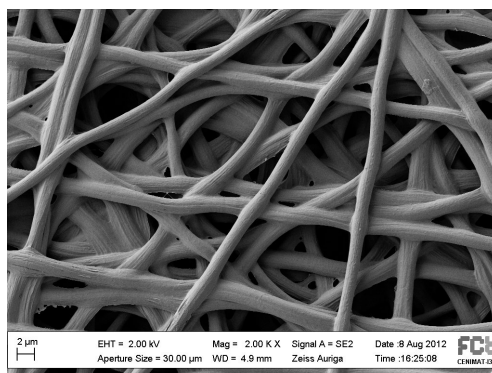
(e) PCL/PVP 20



(f) PCL/PVP 25



(g) PCL/PVP 30



(h) PCL/PVP 60

Figura 3.15: Matrizes de PCL/PVP com vários tempos de reticulação após imersão em água destilada durante 1h no agitador orbital.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

A superfície das fibras de PCL/PVP, após imersão em água, apresenta rugosidades orientadas longitudinalmente, contrastando com a superfície lisa observada nestas fibras pós-produção (figura 3.15). Em particular, as fibras de PCL/PVP 0 (figura 3.15(a)), cujo PVP deverá ter-se dissolvido praticamente na totalidade, encontram-se em grande parte divididas em fibras mais pequenas com diâmetros na ordem da centena de nanómetros. No entanto, em todas as matrizes reticuladas não se observa este efeito, como se o PVP actuasse como uma cola entre as pequenas fibras de PCL.

Foi observado um aspecto semelhante à superfície destas fibras por Li et al. (2012) em fibras obtidas por electrofiação de emulsões de PCL e fibroína de seda.

Numa emulsão existem duas fases, uma fase dispersa constituída por partículas usualmente globulares e uma fase contínua, que tendem a separar-se com o tempo.

Quando as partículas da fase dispersa possuem diâmetros superiores a 100 nm, as emulsões apresentam normalmente um aspecto baço devido às dispersões da luz ao atravessá-las.

No estudo de Li et al. (2012), é sugerido que o efeito na superfície das fibras surge devido à imiscibilidade do PCL com a fibroína e que resulta do estiramento de ambas as fases, incluindo da fase dispersa, durante o processo de electrofiação (figura 3.16) [33].

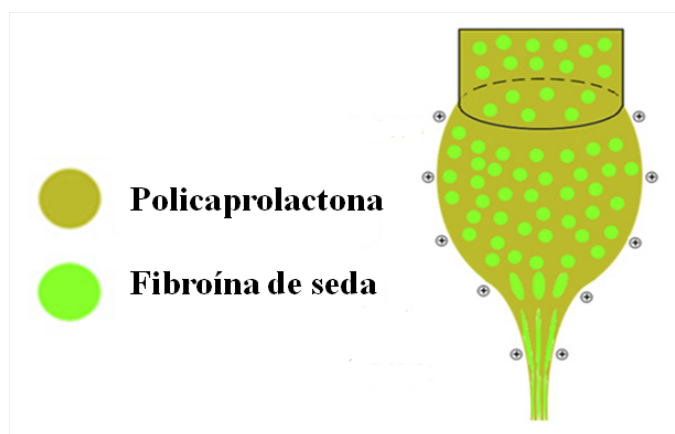


Figura 3.16: Esquema de electrofiação de uma emulsão de PCL e fibroína de seda. Imagem adaptada [33].

Esta é uma provável explicação para os resultados observados nas fibras após imersão em água, já que corrobora as primeiras observações efectuadas à mistura de PCL/PVP no estudo de electrofiação.

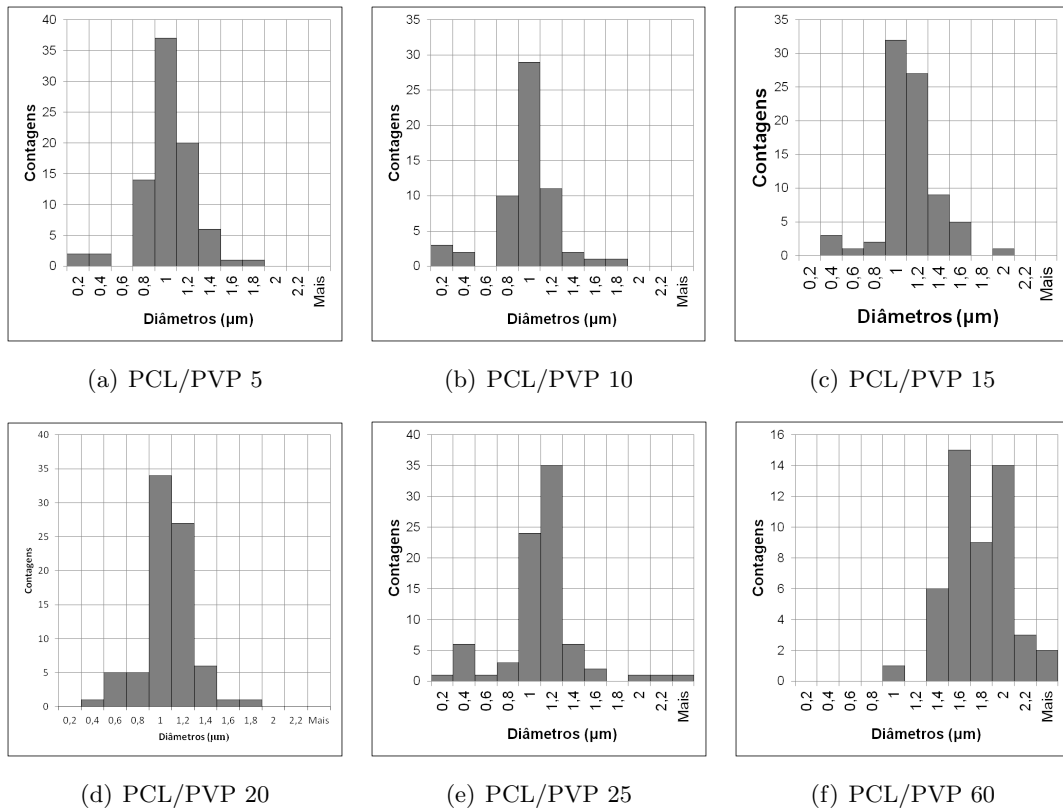


Figura 3.17: Distribuições dos diâmetros das fibras de PVP/PCL após imersão em água com tempos de reticulação: b) 5 min, c) 10 min, d) 15 min e) 20 min, d) 25 min e 60 min.

No geral, o diâmetro das fibras tende a aumentar com o tempo de reticulação, especialmente para a matriz PCL/PVP 60. Esta conclusão é retirada com a análise dos histogramas respectivos (figura 3.17) e não só através dos diâmetros médios calculados, já que algumas amostras contêm algumas fibras de dimensões muito reduzidas e que também são contabilizadas para o valor médio.

Tabela 3.1: Diâmetro médio das fibras de PCL/PVP após imersão em água.

Matriz	Diâmetro médio (μm)	Desvio Padrão (μm)
PCL/PVP 5	0.9	0.3
PCL/PVP 10	0.9	0.3
PCL/PVP 15	1.0	0.3
PCL/PVP 20	1.0	0.2
PCL/PVP 25	1.0	0.4
PCL/PVP 60	1.6	0.3

Não foram realizadas medições dos diâmetros das fibras de PCL/PVP 0 nem PCL/PVP

30 já que não possuem fibras individuais cilíndricas que justifiquem estas medições. No caso da amostra PCL/PVP 30, as fibras encontram-se mais fundidas, não parecendo haver um motivo razoável para este acontecimento nesta matriz em particular. Também é incerto se este aspecto é comum a toda a matriz ou se é específico de algumas regiões, incluindo a região fotografada.

3.2.2 Perda de Massa

A dissolução do PVP não reticulado foi quantificada em termos da percentagem de massa perdida por uma matriz devido à sua imersão em água. A percentagem de massa perdida foi calculada para grupos de matrizes de PCL/PVP com vários tempos de reticulação, tendo-se obtido uma relação de proporcionalidade (figura 3.18) .

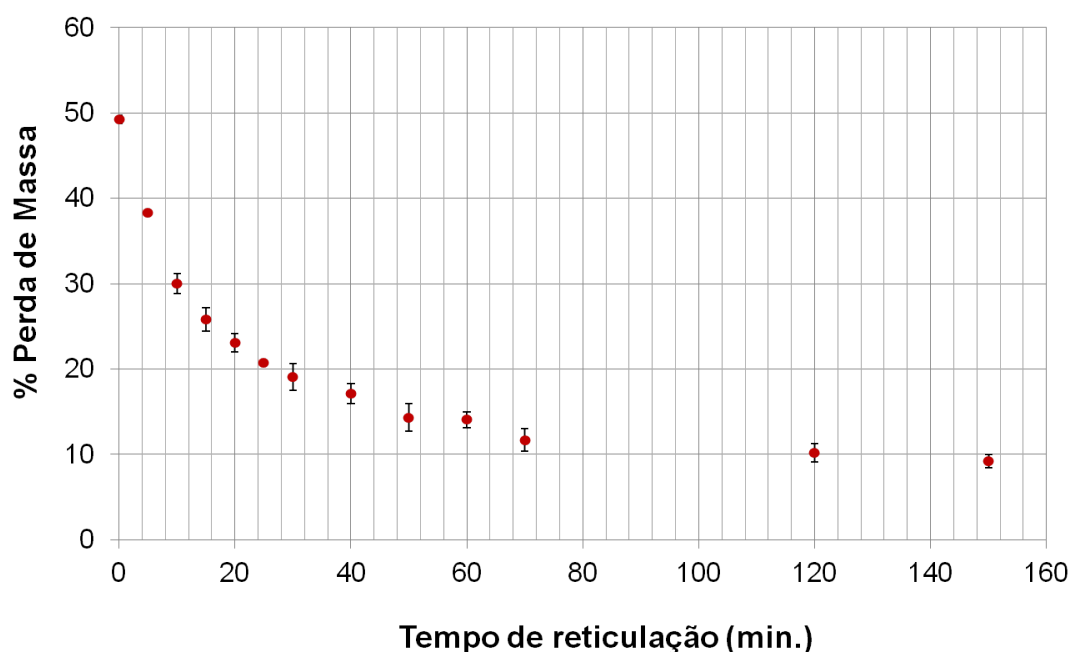


Figura 3.18: Percentagem de perda de massa das fibras de PVP/PCL em função do tempo de reticulação.

Verifica-se que matrizes irradiadas com UV durante mais tempo apresentam uma perda de massa inferior. Este resultado indica que uma maior exposição à radiação UV reticula uma maior percentagem de PVP contido na matriz, tornando-a insolúvel, como previsto. A queda da perda de massa com o tempo de reticulação é mais acentuada durante os primeiros minutos, diminuindo a um ritmo cada vez mais lento.

3.2.3 Ângulos de Contacto

Verificou-se a necessidade de medir o ângulo de contacto nas amostras de PCL/PVP ao longo do tempo já que este não se mantém constante, não parecendo razoável apresentar

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

apenas um valor. Para cada amostra (excepto para a PCL/PVP 60), em cada par de gráficos apresentados, o primeiro mostra as três primeiras medições do ângulo de contacto, em três regiões diferentes da amostra, durante os primeiros segundos (10 imagens/segundo). No segundo gráfico são novamente mostradas as três primeiras medições e também uma quarta medição mais longa (200 ms entre imagens para a amostra PCL/PVP 0 e 1000 ms entre imagens para as restantes) (figura 3.19).

Não foi realizada a quarta medição mais longa na amostra de PCL/PVP 60, já que as gotas são completamente absorvidas durante os primeiros segundos. É de notar que quando a gota é completamente absorvida, o equipamento apresenta dificuldades nas medições de ângulos inferiores a $\approx 25^\circ$, não sendo portanto representados.

Os casos mais particulares destas medições consistem das amostras PCL/PVP 0 e PCL/PVP 60.

As amostras foram lavadas de modo a obter-se a dissolução da percentagem de PVP não reticulado, portanto na amostra de PCL/PVP 0 todo o PVP deveria ter-se dissolvido restando apenas PCL na matriz. Esta amostra apresenta alguma discrepância entre as medições, mas exhibe sempre um decréscimo do ângulo de contacto ao longo do tempo superior ao da amostra de PCL e das amostras de PCL/PVP 5 e PCL/PVP 10. Neste caso, o principal factor a originar estes resultados deverá ser a morfologia da membrana e não as características do material em si. Após dissolução do PVP, esta matriz possui não só metade da sua massa, mas apresenta também uma morfologia muito distinta. Através da observação das respectivas imagens de SEM nota-se que as fibras de PCL restantes à dissolução do PVP encontram-se divididas longitudinalmente, aumentando os espaços contendo ar dentro da matriz. Relativamente à amostra PCL/PVP 60, esta contém quantidade de PVP suficiente para tornar a matriz hidrofílica, absorvendo a gota de água em poucos segundos.

Das amostras PCL/PVP 5, PCL/PVP 10 e PCL/PVP 30, é possível observar-se uma discrepância entre medições da mesma amostra que parece aumentar com o tempo de reticulação do PVP. Também para além do tempo de medição, foi observado que algumas das gotas na mesma amostra acabavam por ser absorvidas enquanto que outras estabilizavam em determinado ângulo. Este acontecimento pode indicar que a distribuição das percentagens de PVP contidas nas matrizes pode resultar em regiões mais hidrofóbicas e outras mais hidrofílicas. No entanto, as medições efectuadas e a sua duração não são suficientes para clarificar esta situação. No geral, é possível observar ângulos de contacto inferiores com tempos de reticulação maiores, ou seja, com maiores percentagens de PVP contido na matriz, como esperado.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

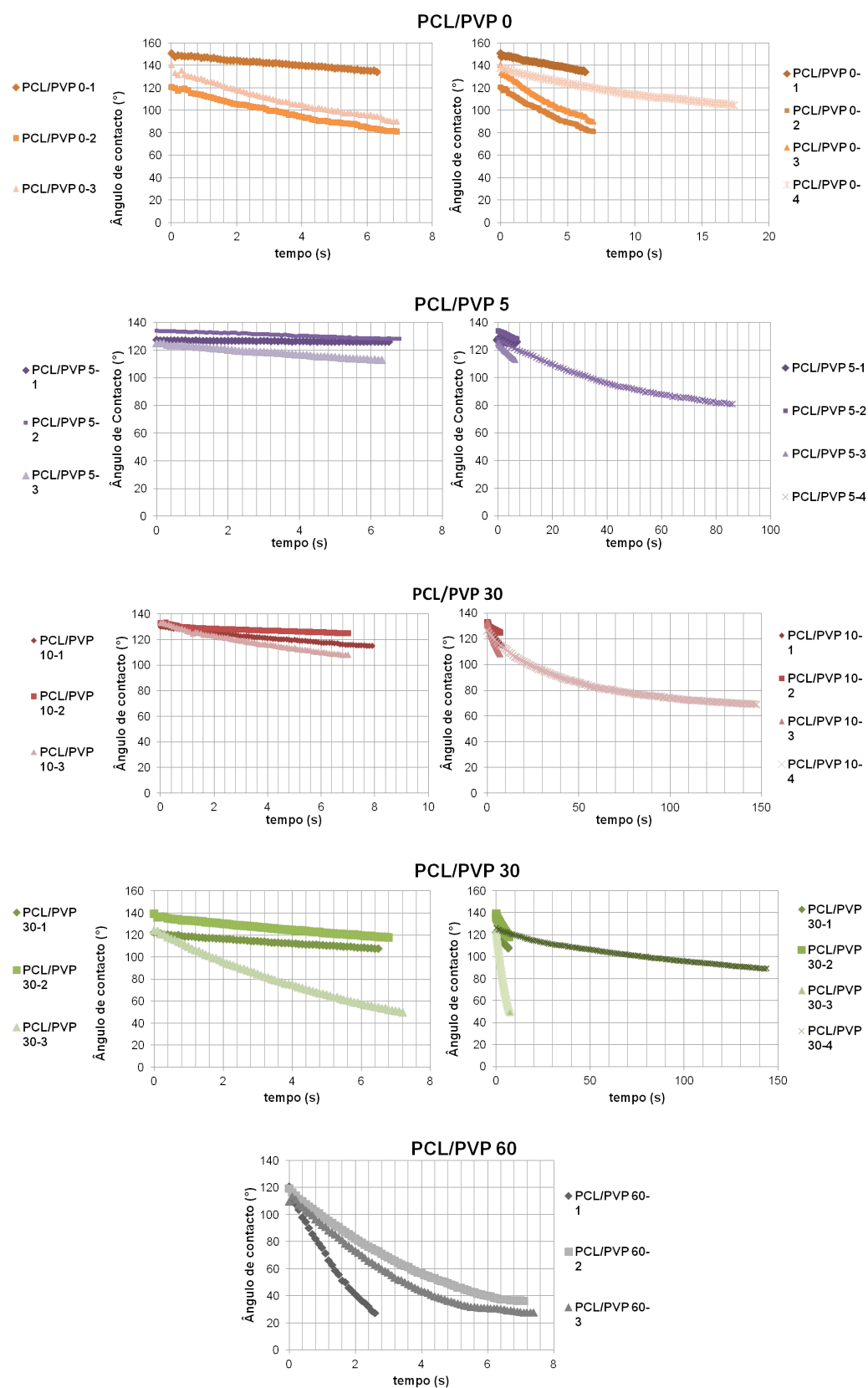


Figura 3.19: Ângulos de contacto medidos ao longo do tempo em matrizes desalinhasadas de PCL/PVP com tempos de reticulação: 0, 5, 10, 30 e 60 minutos.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

O ângulo de contacto das amostras de PCL foi medido também ao longo de alguns segundos, no entanto, nesta matriz o ângulo não apresenta variações significativas com o tempo, permanecendo estável (figura 3.20). Das três medições efectuadas, obteve-se um ângulo de contacto médio de $137 \pm 3^\circ$.

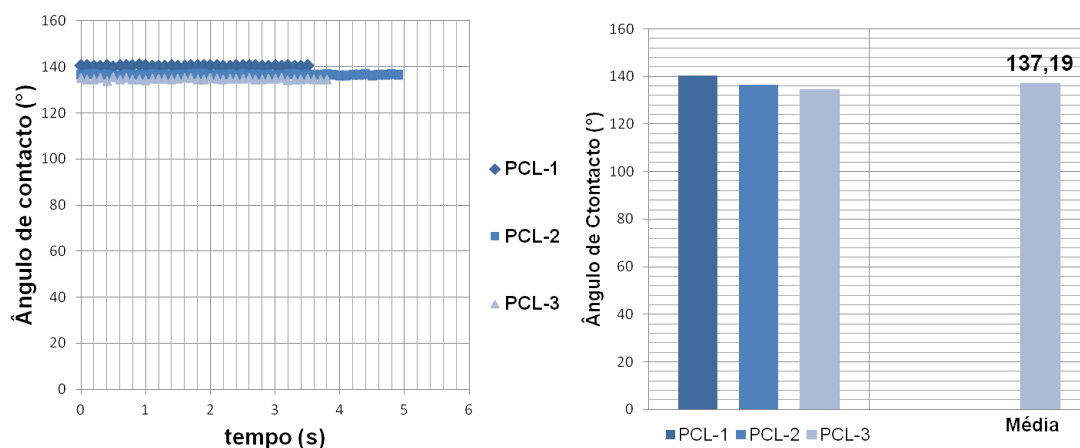


Figura 3.20: Medições dos ângulos de Contacto da matriz de PCL.

Fazendo uma média de todas as medições durante os primeiros cinco segundos, verifica-se para todas as matrizes que contêm PVP uma diminuição do ângulo de contacto com o aumento do teor de PVP na matriz, indicando que maiores quantidades de PVP tornam a matriz mais hidrofílica, tal como era previsto (figura 3.21).

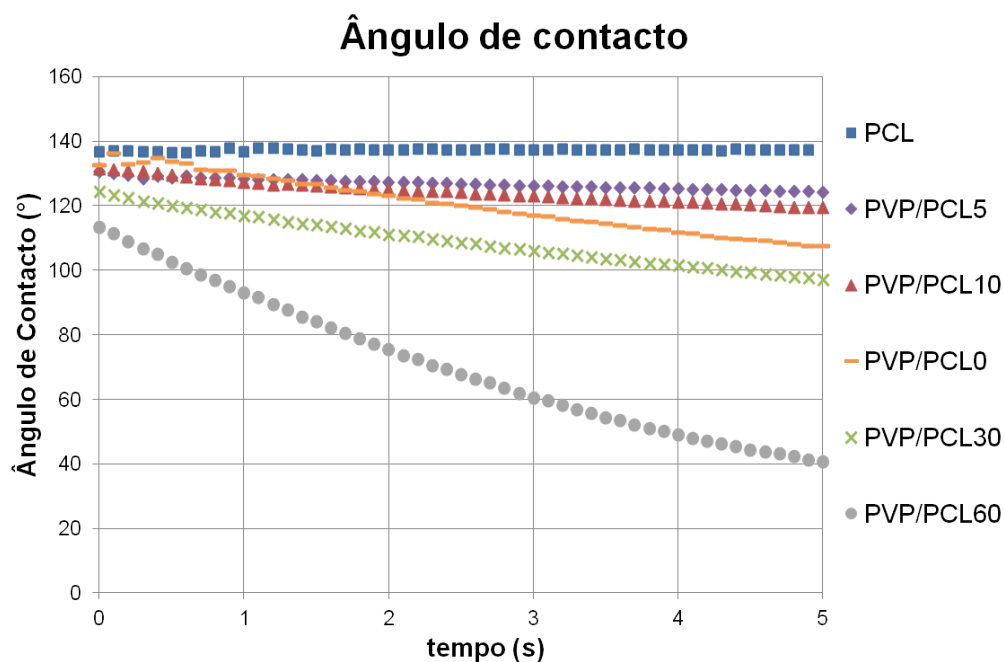


Figura 3.21: Ângulos de Contacto das matrizes de PCL, PCL/PVP 0, PCL/PVP 5, PCL/PVP 10, PCL/PVP 30 e PCL/PVP 60 ao longo do tempo.

Tendo em conta as medições realizadas à amostra PCL/PVP 60, pode-se considerar que percentagens de PVP na matriz acima de $\approx 40\%$ (perda de massa $\approx 14\%$) atribuem um carácter hidrofílico à matriz.

3.3 Cultura Celular

3.3.1 Adesão

1º Ensaio

No 1º ensaio de adesão foram semeadas células em matrizes de PCL, PCL/PVP com tempos de reticulação 0, 5, 10, 30 e 60 e em lamelas de vidro (controles positivos) numa placa de 48 poços. Também foram semeadas células em lamelas de vidro colocadas em poços cujas paredes continham cola de vácuo Dowcorning. O teste de citotoxicidade realizado à cola revelou que esta não é citotóxica, já que as células nesses poços exibem morfologia semelhante aos controlos e em quantidades equiparáveis (figuras 3.22(a) e 3.22(b)).

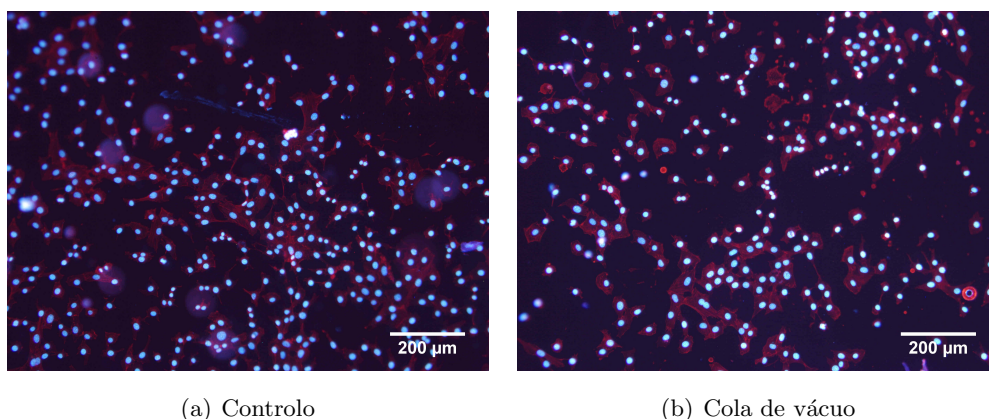


Figura 3.22: Células aderidas a lamelas de vidro em poços de um Controlo positivo e de um Teste de citotoxicidade à Cola de vácuo

As células semeadas nas lamelas de vidro exibem núcleos arredondados, indicativos de que estas células se encontravam vivas na altura da fixação (figura 3.22). No caso de apoptose ou necrose, o núcleo apresentaria um aspecto mais irregular e fragmentado que seria visível através da marcação com DAPI.

A marcação com Faloidina revela os filamentos extensos de actina do citoesqueleto das células e indica que estas aderiram bem à lamela. Também o facto das células se encontrarem afastadas umas das outras é indicativo de que a adesão ao substrato é preferencial à adesão entre as células, um comportamento que é normal nas células 3T3.

As imagens obtidas das células em matrizes de PVP/PCL revelaram uma adesão diferente da que acontece nos controlos. Na imagem são visíveis células em matrizes de PVP/PCL com tempos de reticulação do PVP entre 5 e 60 minutos. De acordo com os resultados obtidos

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

do estudo de perda de massa, todas estas matrizes possuem uma determinada percentagem de PVP, com as matrizes sujeitas a maiores tempos de reticulação possuindo maior percentagem de PVP.

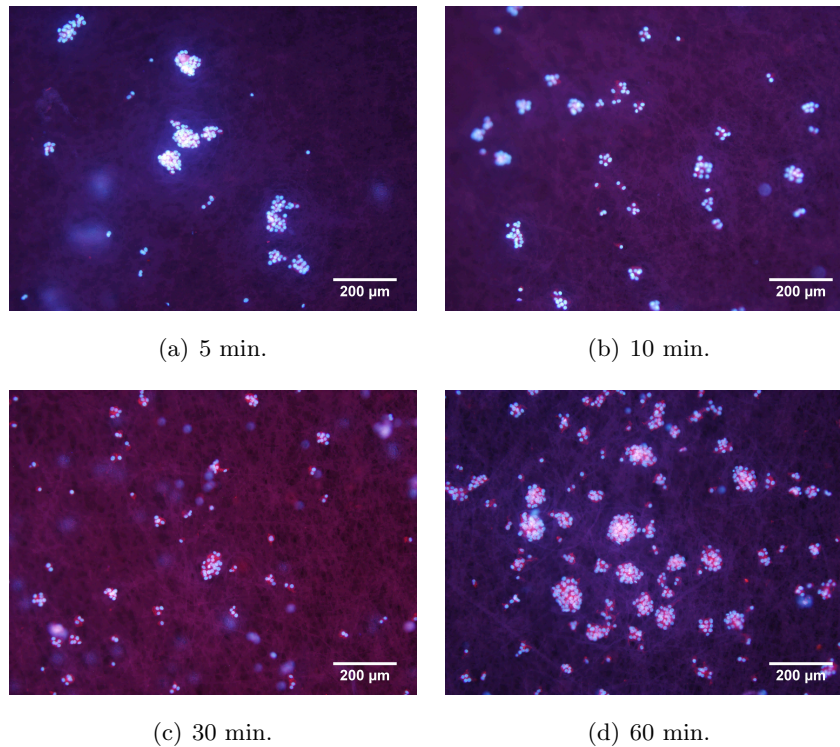


Figura 3.23: Fibroblastos 3T3 em matrizes de PVP/PCL com diferentes tempos de reticulação.

Independentemente do tempo de reticulação, as células exibem um corpo celular menos expandido e comprimido em redor do núcleo, distribuindo-se na matriz em pequenos agregados (figura 3.23). Apesar desta morfologia indicar uma fraca força de adesão ao substrato, não foram detectados núcleos com aspecto indicativo de morte celular.

Entre as matrizes de PCL/PVP, observa-se um maior número de células com o aumento do tempo de reticulação, em especial para a matriz reticulada durante 60 minutos. Para esta análise, deve ter-se em conta que o processo de marcação das células implica uma manipulação das matrizes que pode influenciar estes resultados. Isto deve-se ao facto de que as matrizes mais reticuladas possuem maior rigidez sofrendo menos deformação quando são manipuladas, em especial a matriz PVP/PCL 60 cuja manipulação é mais fácil, não ocorrendo grandes deformações, semelhante ao que acontece com a matriz de PCL. Em contrapartida, as matrizes menos reticuladas deformam-se dobrando sobre si próprias ao serem retiradas do meio líquido. Apesar das matrizes voltarem à sua forma inicial ao serem colocadas novamente no meio líquido, estas manipulações podem arrastar as células, principalmente se estas não se encontrarem bem aderidas ao substrato.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Já nas matrizes de PCL, as células revelam muitas fibras de F-actina sugerindo a existência de múltiplas adesões, integrando-se na estrutura fibrosa tridimensional. É possível observar uma grande quantidade de células distribuídas ao longo da matriz não exibindo tendência para formação de agregados. Este aspecto das células já deverá ser indicativo de uma adesão mais forte ao substrato e também preferencial à adesão célula-célula.

Curiosamente, nas matrizes produzidas com PCL/PVP mas que não foram reticuladas (PCL/PVP 0), a adesão celular assemelha-se às matrizes de PVP/PCL reticuladas e não às matrizes de PCL.

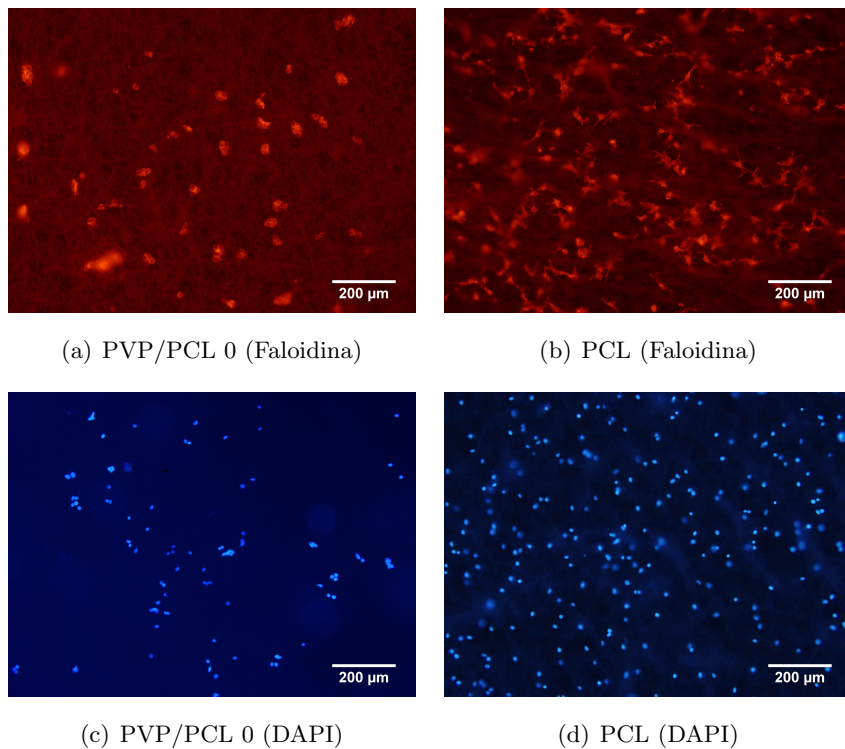


Figura 3.24: Comparação da matriz de PCL com a matriz de PVP/PCL0 após dissolução do PVP.

Para dissolução do PVP, estas matrizes foram imersas em água destilada durante 1h no agitador orbital previamente à cultura celular. Para além disso, as matrizes foram também sujeitas a várias lavagens com Etanol 70%, PBS e água Ultrapura durante o processo de esterilização. O estudo de perda de massa indica que o PVP deve ter-se dissolvido praticamente na sua totalidade nestas condições.

Na figura 3.24 pode ser comparado o comportamento das células entre uma matriz de PVP/PCL 0 e uma matriz de PCL em termos quantitativos, através do número de núcleos, e qualitativos através da extensão das protusões celulares.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Novamente na matriz de PVP/PCL 0, podem ser observados pequenos agregados celulares e corpo celular menos expandido exibindo poucas protusões. Esta matriz foi a que apresentou maiores dificuldades na sua manipulação deformando-se extensivamente ao ser retirada do meio líquido durante os processos de marcação fluorescente.

2º Ensaio

No 2º Ensaio de adesão as células foram fixadas e marcadas com DAPI após um dia de cultura e os núcleos foram observados com microscopia de fluorescência. Neste ensaio foi também realizado um ensaio de viabilidade com o reagente PrestoBlue™. No 1º ensaio tinham sido observadas algumas células aderidas ao fundo dos poços de cultura para além das aderidas às lamelas ou matrizes. Como o metabolismo destas células iria contribuir para os resultados obtidos num ensaio de viabilidade celular, tornou-se necessário encontrar uma alternativa que impedisse o arrastamento das células para fora das lamelas ou das matrizes. Foi este motivo que levou à decisão da utilização dos anéis de aço inoxidável.

Antes da realização do ensaio de viabilidade celular, as células dos controlos (com e sem anéis) foram observadas ao microscópio de contraste de fase da sala de culturas. Foi observado que as células nos poços com anéis encontravam-se com aspecto arredondado, pouco aderidas à lamela. As células nos controlos sem anel possuíam as extensões do citoesqueleto características de uma boa adesão, tais como tinham sido observadas anteriormente no 1ª ensaio de adesão. Como não foi realizada a marcação do citoesqueleto, não foram retiradas mais conclusões sobre este assunto ao longo desta experiência, ficando a dúvida da existência de algum efeito indesejável provocado pelos anéis utilizados.

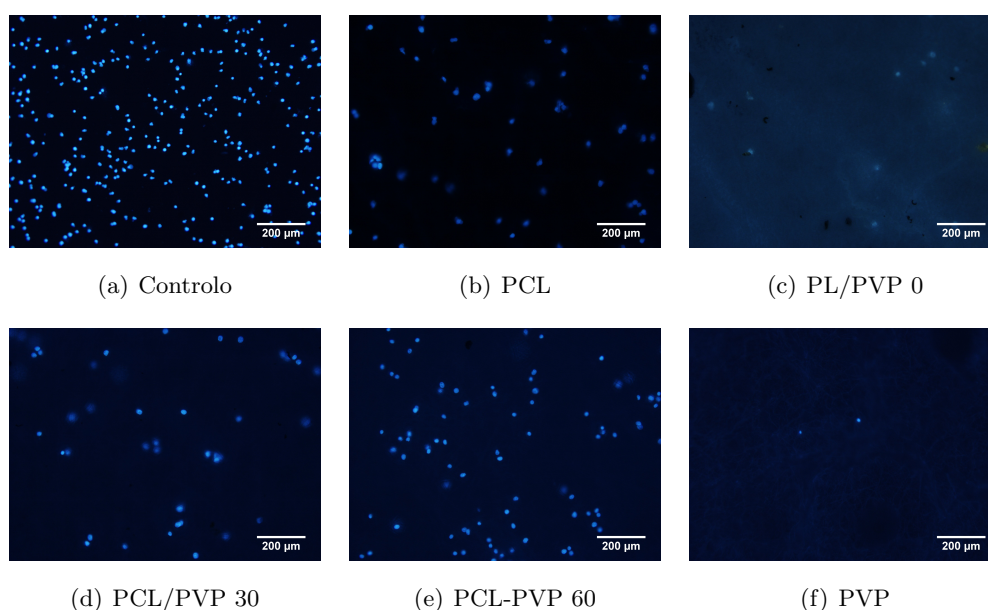


Figura 3.25: Núcleos das células aderidas às matrizes e controlos no 2º ensaio de adesão celular.

Os resultados obtidos da observação dos núcleos com microscópio de fluorescência revelaram, novamente, uma maior quantidade de células nas matrizes de PCL e de PCL/PVP 60 (figura 3.25). A matriz de PVP possui uma característica adicional que dificulta a observação ao microscópio. Esta matriz tem a capacidade de absorver uma grande quantidade de líquido aumentando muito o seu volume. Como as matrizes são observadas enquanto estão molhadas em PBS, as células na matriz de PVP distribuem-se ao longo de todo o seu volume impedindo a observação de todos os núcleos focando num só plano. Deste modo, não só é difícil avaliar a quantidade de núcleos durante a observação, mas também as fotografias tiradas podem não ser características da quantidade de células existentes.

3º Ensaio

As amostras produzidas por electrofiação para o 3º ensaio de adesão resultaram em deposições menos espessas que dificultaram os processos entre a fixação e a marcação com fluorescência. As amostras especialmente afectadas foram as PCL/PVP 0 e PCL/PVP 30, tendo sido já anteriormente verificado a difícil manipulação destas amostras.

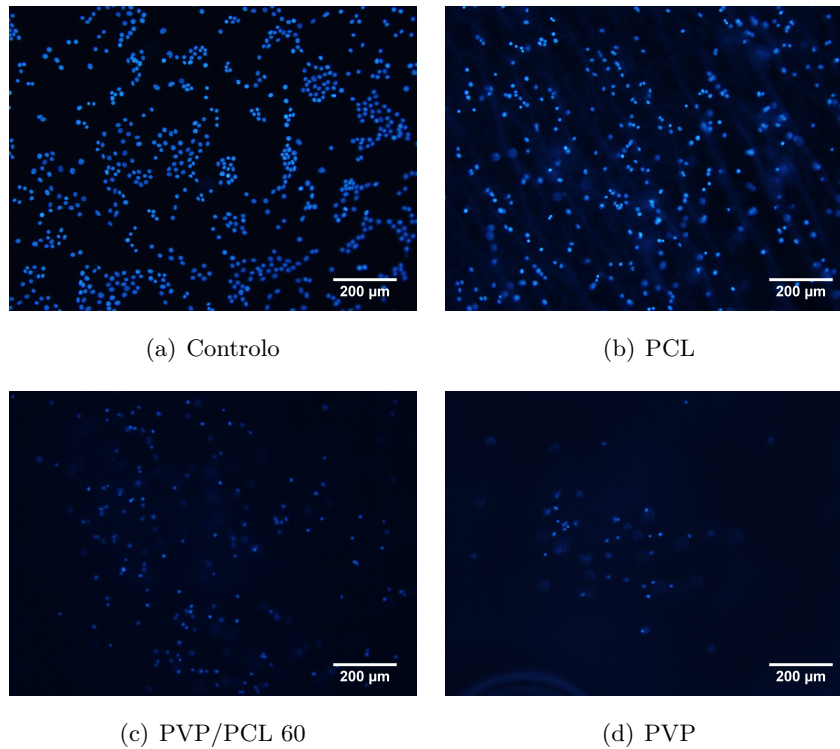


Figura 3.26: Núcleos das células aderidas às matrizes e controles no 3º ensaio de adesão celular.

Após as lavagens com PBS e as deformações sofridas pelas matrizes de PCL/PVP 0 e PCL/PVP 30, não se conseguiu obter imagens de fluorescência representativas dos núcleos das células contidas nestas matrizes. No entanto, foi possível observar muitos núcleos nas matrizes de PCL e PCL/PVP 60 e também nos controles (figura 3.26).

4º Ensaio

O 4º ensaio de adesão revelou resultados muito semelhantes aos observados na primeira experiência. Observa-se novamente uma tendência das células 3T3 formarem agregados nas matrizes de PCL/PVP e um maior número de células na matriz PCL/PVP 60. A formação de agregados não se verifica na matriz de PCL nem nos controles. Também não parece ocorrer na matriz de PVP, apesar da sua observação ser dificultada devido ao grande volume da amostra quando molhada. A distribuição das células ao longo deste volume impede a sua focalização no mesmo plano, dificultando uma avaliação quantitativa do número de núcleos para comparação com as restantes matrizes. Na matriz de PCL foi observada uma grande quantidade de núcleos semelhante à encontrada nos controles.

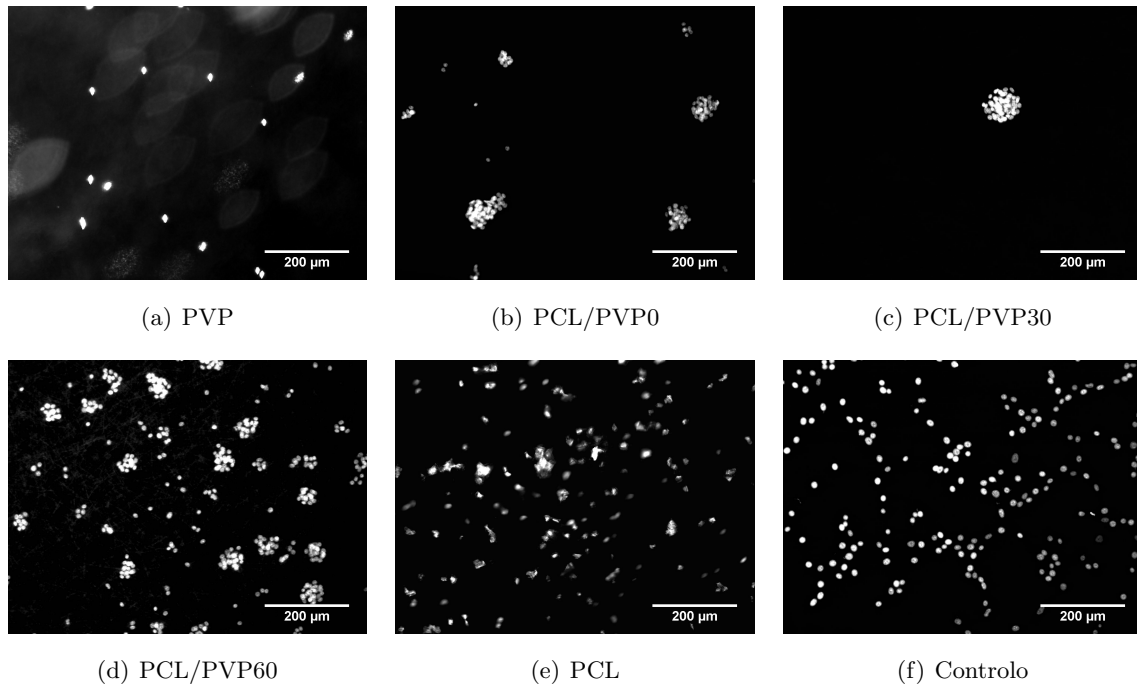


Figura 3.27: Núcleos das células aderidas às matrizes e controlos no 3º ensaio de adesão celular.

Pode ser observada ainda outra diferença nas imagens de fluorescência entre os resultados obtidos nas matrizes de PCL e PCL/PVP. As células nas matrizes de PCL/PVP não só se encontram em agregados como são mais facilmente focadas no mesmo plano comparativamente às de PCL. Os núcleos na matriz de PCL aparentam estar em vários planos e até por baixo das fibras, indicando que as células invadiram a matriz até determinado ponto. Já nas matrizes de PCL/PVP, as células parecem encontrar-se à superfície não se integrando na matriz (figura 3.27).

Como principais conclusões dos ensaios de adesão, pode dizer-se que as células 3T3 utilizadas aderiram bem às matrizes de PCL formando diversos pontos de contacto, integrando-se entre as fibras. A sua adesão a matrizes de PCL/PVP aparentou ser fraca, muitas vezes preferindo os contactos com outras células em vez de contactos com a matriz. Risbud et al. (2000) observaram a inibição do crescimento de fibroblastos 3T3 em hidrogéis de PVP e Quitosano. Apesar de terem observado alguma proliferação dos fibroblastos ao longo de três dias de cultura, as células exibiram forma redonda aderindo pouco. Nesse artigo apenas é mencionado que este comportamento está relatado na literatura para substratos de Quitosano [44]. Noutro estudo também com fibroblastos de ratinho 3T3, Grover et al. (2010) sugeriram que o PVP, não sendo citotóxico, pode ser citostático para os fibroblastos, já que parece ter causado uma diminuição na adesão e proliferação relativamente a substratos semelhantes, mas sem PVP [45].

3.3.2 Proliferação

Na experiência para avaliação da proliferação de células nas matrizes, estas foram mantidas em cultura durante 3 dias e marcadas com DAPI e Faloidina. A observação das células por microscopia de fluorescência revelou uma adesão semelhante à observada no 1º ensaio de adesão. Para além disso, foi também observada proliferação celular em todas as matrizes, incluindo nas matrizes de PVP/PCL onde a adesão tinha revelado ser mais fraca. Como exemplo, na figura 3.28 podem ser comparadas as matrizes PVP/PCL 5 e PVP/PCL 30 fixadas ao 1º e 3º dia de cultura (figura 3.28).

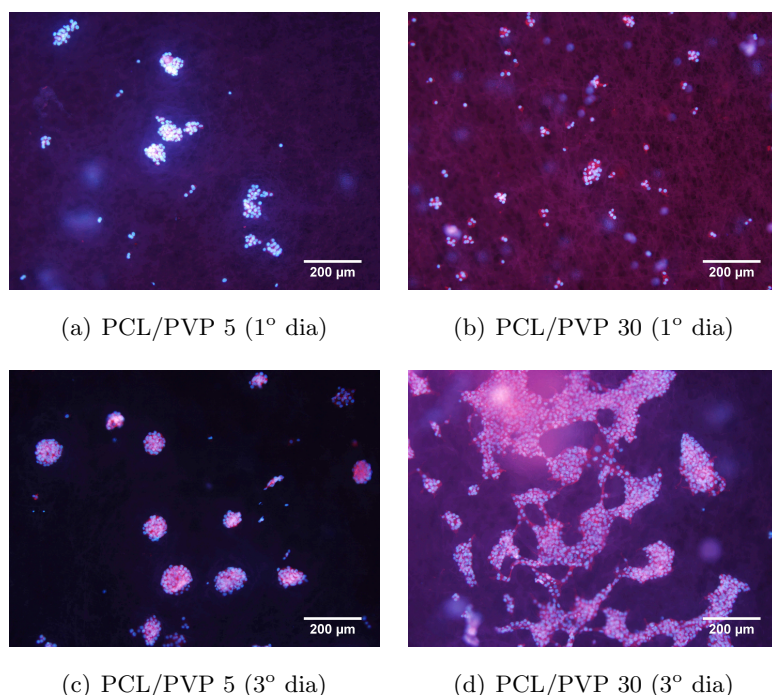


Figura 3.28: Matrizes de PCL/PVP 5 e PCL/PVP 30 após um e três dias em cultura.

Nestas matrizes as células proliferaram verificando-se um maior número de agregados e agregados de maiores dimensões. Já nas matrizes de PCL a observação ao microscópio foi mais difícil tendo-se observado muitas células em planos de focagem diferentes, obtendo-se imagens com muitas manchas fluorescentes. No entanto, este resultado indica que existe um grande número de células, superior ao observado nas células em cultura durante um dia, concluindo-se que esta matriz também suporta a proliferação das células 3T3 utilizadas.

3.4 Viabilidade

Os resultados obtidos através do estudo de viabilidade recorrendo ao reagente PrestoBlue™ revelaram algumas inconstâncias, não só entre as três diferentes culturas (figura 3.29), mas também relativamente às observações com microscopia de fluorescência.

O valor de absorvância relativo ao PCL na 2ª cultura é extremamente baixo, apesar

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

de terem sido observados muitos núcleos nesta matriz através da marcação com DAPI. Já nas duas culturas seguintes, o PCL possui os valores mais altos de absorvância entre todas as matrizes, resultado que já se encontra mais em concordância. Na 3ª cultura também se observou um valor demasiado elevado no controlo negativo, não sendo considerado uma medida razoável para a análise deste estudo.

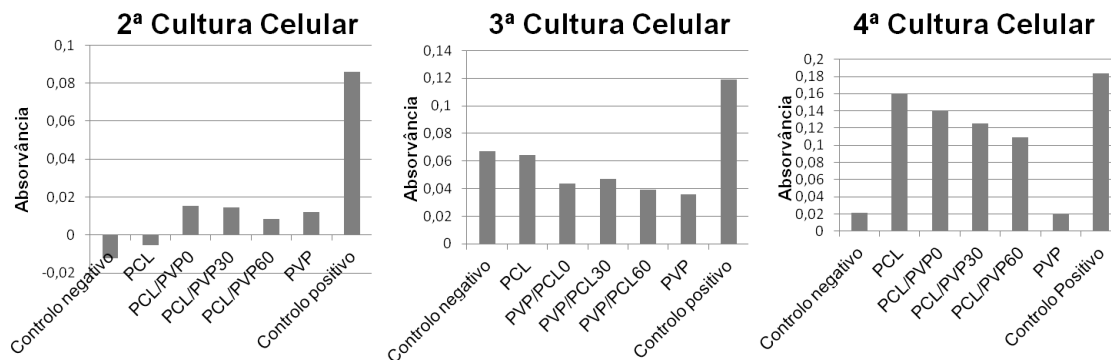
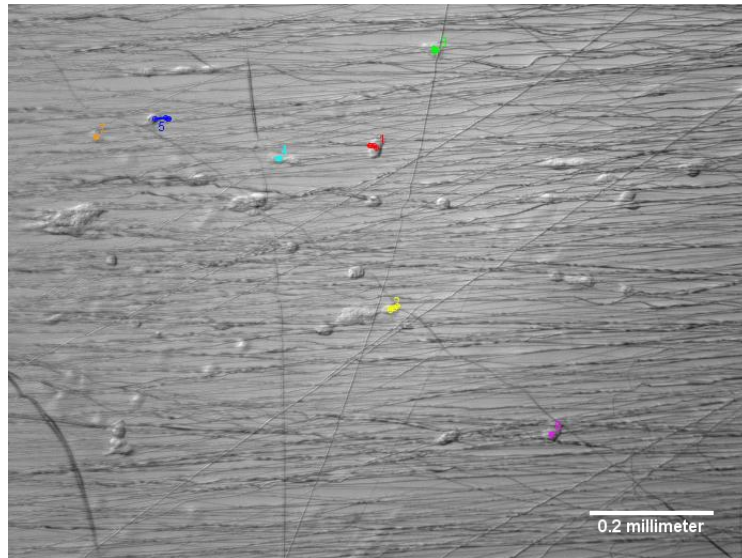


Figura 3.29: Medições de Absorvância resultantes do ensaio de viabilidade celular.

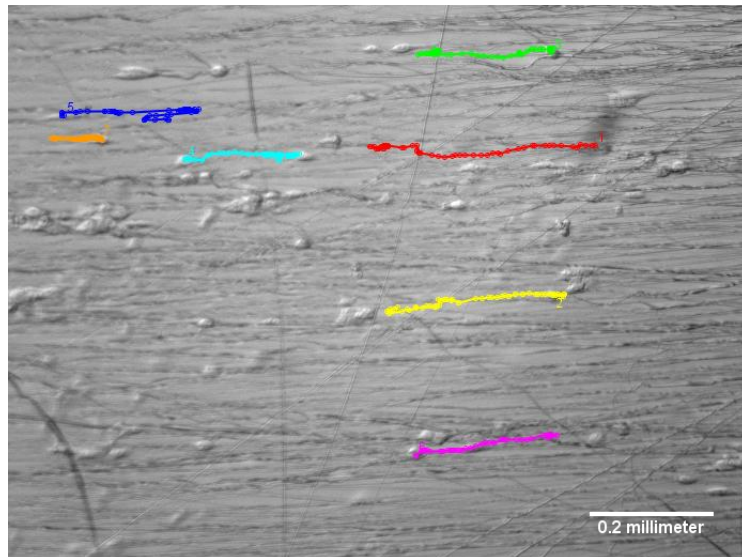
No geral, este estudo indica que a viabilidade celular é menor para matrizes contendo maior quantidade de PVP. Esta observação contrasta com os resultados obtidos com microscopia de fluorescência. Seria necessário adoptar algumas alterações nos protocolos de marcação fluorescente e também do reagente PrestoBlue™ para melhor compreender estes resultados.

3.5 Migração

Como foi observada uma menor capacidade de adesão das células às matrizes de PCL/PVP, optou-se, numa primeira fase, por utilizar uma matriz de PCL para o ensaio de migração ao longo de fibras alinhadas.



(a) 1 hora após início do ensaio (imagem 10/205)



(b) 20h30 após o início do ensaio (205/205)

Figura 3.30: Imagens do início e fim do ensaio de migração celular, com o percurso seguido de sete células.

O filme foi produzido em modo *time-lapse*, com seis minutos de tempo real decorrido entre fotografias, durante 20 horas e 30 minutos (205 imagens). A visualização em sequência das fotografias e a baixa velocidade de migração das células permite a observação do comportamento de cada célula na amostra.

Podem ser observados vários comportamentos distintos das células, verificando-se que todas elas aderem às fibras de PCL. Foram seleccionadas sete células que apresentam uma maior mobilidade e o seu movimento foi seguido através do recurso à aplicação informática ImageJ e ao *plugin* mTrackJ [43]. Foi assim possível determinar as velocidades de migração que constam na tabela 3.2.

CAPÍTULO 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Tabela 3.2: Distâncias percorridas e velocidades médias das sete células seguidas durante o ensaio de migração (20h30, 205 imagens).

Célula	Cor	Distância percorrida (μm)	Velocidade média ($\mu\text{m}/\text{h}$)
1	vermelho	414	20.2
2	amarelo	354	17.3
3	verde	298	14.5
4	azul claro	302	14.7
5	azul escuro	437	21.3
6	laranja	277	13.5
7	rosa	250	12.2

A velocidade de migração média do conjunto das células observadas é de $16 \pm 3 \mu\text{m}/\text{h}$.

As velocidades médias para cada célula foram calculadas somando as distâncias percorridas, em linha recta, por cada três imagens (18 minutos). De notar que, como foram seleccionadas as células com maior mobilidade, esta velocidade deve ser entendida como uma estimativa do valor máximo. Com efeito, podem observar-se células que invertem o sentido de migração espontaneamente ou que colidem com outras células, resultando daqui uma velocidade média inferior.

É também importante referir que se verifica uma maior dificuldade de migração, no mesmo sentido, quando as células se encontram em contacto com outras células. Observou-se que quando uma célula sai de um agregado celular, inicia uma migração isolada mais rápida e percorre distâncias maiores no mesmo sentido.

Por último, com este tipo de microscopia não foi possível distinguir casos específicos de proliferação celular.

4

Conclusões e Perspectivas

Neste trabalho foi avaliado o comportamento de células 3T3 em misturas de Polivinilpirrolidona (PVP) e Policaprolactona (PCL), como primeira abordagem ao estudo de produção de matrizes poliméricas para fabricação de enxertos vasculares.

Foram produzidas matrizes a partir de uma solução de 14% PCL/PVP (1:1) em Ácido Acético recorrendo à técnica de electrofiação. Estas matrizes foram depositadas num colector cilíndrico em rotação, tendo-se obtido maior grau de alinhamento das fibras em função da velocidade do colector. Para além destas, foram produzidas matrizes de PCL e PVP a partir de soluções de 20% PCL em Ácido Acético e 18% PVP em Água/Etanol (3:1).

As matrizes de PCL/PVP foram reticuladas com diferentes tempos de irradiação com Ultra-Violeta para impedir a dissolução do PVP quando em contacto com os fluídos corporais. Constatou-se que um maior tempo de reticulação produz uma menor perda de massa de PVP por dissolução em água. Através de medições dos ângulos de contacto, concluiu-se percentagens maiores de PVP proporcionam um carácter mais hidrofílico às matrizes.

A morfologia das fibras não reticuladas após imersão em água foi observada com SEM, revelando que o PCL se encontra distribuído em fibras mais pequenas ao longo das fibras de PCL/PVP. Sugere-se que este efeito pode ser devido a uma separação de fases dos polímeros na solução.

Os resultados obtidos da cultura celular revelaram que as células 3T3 aderiram com maior dificuldade às matrizes de PCL/PVP comparativamente a matrizes de PCL. Os estudos de proliferação e viabilidade celular indicaram que as células sobrevivem e proliferam em todas

as matrizes, tendo sido obtidos resultados discrepantes sobre as consequências da percentagem de PVP contida na matriz.

As características mais interessantes do PVP para o fundamento deste trabalho são a sua hidrofilicidade e, em especial, a sua boa hemocompatibilidade como material não trombogénico. Esta qualidade seria particularmente atractiva no lúmen do enxerto, onde se pretende um revestimento confluyente de células endoteliais. Os fibroblastos e células endoteliais são predominantes em diferentes tipos de tecidos, com os fibroblastos como componente celular principal de tecidos ricos em matriz extracelular, e as células endoteliais predominando em regiões com maior densidade celular e pouca matriz extracelular. Deste modo considerar-se-ia muito interessante estudar o comportamento de células endoteliais nas matrizes de PCL/PVP.

Foi realizado um último ensaio de migração celular através da produção de um filme em *time-lapse* de células em cultura sobre uma matriz alinhada de PCL. Observou-se que a migração ocorre na direcção do alinhamento das fibras, tendo sido calculada uma velocidade média de $16 \pm 3 \mu\text{m/h}$ para sete células como sendo a velocidade máxima estimada de migração. As células com maior velocidade de migração encontravam-se isoladas, não permanecendo aderidas a outras células, durante grande parte do ensaio.

Seria também interessante estudar a migração colectiva das células em matrizes com camadas de diferentes graus de alinhamento. Este tipo de ensaio ajudaria a explicar melhor o que aconteceria *in vivo* durante a invasão do enxerto por uma população de células.

Outros estudos que ajudariam a avaliar o potencial deste tipo de matrizes como enxertos vasculares seriam testes às suas propriedades mecânicas. Na produção de um enxerto tubular em camadas, podem ser utilizados diferentes graus de alinhamento de modo a imitar a arquitectura dos vasos sanguíneos nativos. Neste sentido, o PVP parece ser uma ferramenta útil para manter a coesão entre as camadas, já que se verificou que ele age como promotor de aderência entre as fibras de PCL.

Bibliografia

- [1] H. Federation, “Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control,” *Organization*.
- [2] a. D. Michaels, “Angioplasty Versus Bypass Surgery for Coronary Artery Disease,” *Circulation*, vol. 106, pp. 187e–190, Dec. 2002.
- [3] R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, “Current status of prosthetic bypass grafts: a review.,” *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 74, pp. 570–81, July 2005.
- [4] M. R. Kapadia, D. a. Popowich, and M. R. Kibbe, “Modified prosthetic vascular conduits.,” *Circulation*, vol. 117, pp. 1873–82, Apr. 2008.
- [5] D. Eberli, *Tissue Engineering*. In-Teh, 2010.
- [6] Y. Naito, T. Shinoka, D. Duncan, N. Hibino, D. Solomon, M. Cleary, A. Rathore, C. Fein, S. Church, and C. Breuer, “Vascular tissue engineering: towards the next generation vascular grafts.,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 63, pp. 312–23, Apr. 2011.
- [7] R. R. Seeley, T. D. Stephens, and P. Tate, *Anatomia e fisiologia*. LusoCiência, 6^Â ed., 2003.
- [8] E. W. Raines, “The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease.,” *International journal of experimental pathology*, vol. 81, pp. 173–82, June 2000.
- [9] K. Wolf and P. Friedl, “Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration.,” *Trends in cell biology*, vol. 21, pp. 736–44, Dec. 2011.
- [10] D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, W. Shen, D. I. Finkelstein, and M. K. Horne, “Review paper: a review of the cellular response on electrospun nanofibers for tissue engineering.,” *Journal of biomaterials applications*, vol. 24, pp. 7–29, July 2009.
- [11] S. J. Lee, J. J. Yoo, G. J. Lim, A. Atala, J. Stitzel, N. Carolina, and L. E. E. E. T. Al, “In vitro evaluation of electrospun nanofiber scaffolds for vascular graft application,” *Solutions*, 2007.

- [12] M. J. McClure, S. a. Sell, D. G. Simpson, B. H. Walpoth, and G. L. Bowlin, “A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: a preliminary study,” *Acta biomaterialia*, vol. 6, pp. 2422–33, July 2010.
- [13] S. G. Wise, M. J. Byrom, A. Waterhouse, P. G. Bannon, A. S. Weiss, and M. K. C. Ng, “A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties,” *Acta biomaterialia*, vol. 7, pp. 295–303, Jan. 2011.
- [14] S. de Valence, J.-C. Tille, D. Mugnai, W. Mrowczynski, R. Gurny, M. Möller, and B. H. Walpoth, “Long term performance of polycaprolactone vascular grafts in a rat abdominal aorta replacement model,” *Biomaterials*, vol. 33, pp. 38–47, Jan. 2012.
- [15] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, and Z. Ma, *An introduction to electrospinning and nanofibers*, vol. 96. World Scientific, 2005.
- [16] P. Q. Franco, J. Silva, and J. P. Borges, “Produção de fibras de hidroxipatite Por electrofição,” *Ciência & Tecnologia dos Materiais*, vol. 22, pp. 57–64, 2010.
- [17] Q. P. Pham, U. Sharma, and A. G. Mikos, “Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review,” *Tissue engineering*, vol. 12, pp. 1197–211, May 2006.
- [18] F. Xu, F.-Z. Cui, Y.-P. Jiao, Q.-Y. Meng, X.-P. Wang, and X.-Y. Cui, “Improvement of cytocompatibility of electrospinning PLLA microfibers by blending PVP,” *Journal of materials science. Materials in medicine*, vol. 20, pp. 1331–8, June 2009.
- [19] F. Ran, S. Nie, W. Zhao, J. Li, B. Su, S. Sun, and C. Zhao, “Biocompatibility of modified polyethersulfone membranes by blending an amphiphilic triblock co-polymer of poly(vinyl pyrrolidone)-b-poly(methyl methacrylate)-b-poly(vinyl pyrrolidone),” *Acta biomaterialia*, vol. 7, pp. 3370–81, Sept. 2011.
- [20] A. Higuchi, K. Shirano, M. Harashima, B. O. Yoon, M. Hara, M. Hattori, and K. Imamura, “Chemically modified polysulfone hollow fibers with vinylpyrrolidone having improved blood compatibility,” *Biomaterials*, vol. 23, pp. 2659–66, July 2002.
- [21] L. C. Lopergolo, “São Paulo 2002,” 2002.
- [22] L. C. Lopérgolo, A. B. Lugão, and L. H. Catalani, “Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels,” *Polymer*, vol. 44, pp. 6217–6222, Sept. 2003.
- [23] E. Of, P. On, and T. H. E. Liver, “Polyvinylpyrrolidone (PVP),” 1955.
- [24] L. a. Bosworth and S. Downes, “Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds,” *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, pp. 2269–2276, Dec. 2010.

- [25] S. J. Lee, J. Liu, S. H. Oh, S. Soker, A. Atala, and J. J. Yoo, "Development of a composite vascular scaffolding system that withstands physiological vascular conditions.," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2891–8, July 2008.
- [26] J. Venugopal, Y. Z. Zhang, and S. Ramakrishna, "Fabrication of modified and functionalized polycaprolactone nanofibre scaffolds for vascular tissue engineering.," *Nanotechnology*, vol. 16, pp. 2138–42, Oct. 2005.
- [27] K. Wulf, M. Teske, M. Löbner, F. Luderer, K.-P. Schmitz, and K. Sternberg, "Surface functionalization of poly(ϵ -caprolactone) improves its biocompatibility as scaffold material for bioartificial vessel prostheses.," *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, vol. 98, pp. 89–100, July 2011.
- [28] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts.," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2583–9, 2005.
- [29] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century.," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, pp. 1217–1256, Oct. 2010.
- [30] G. R. da Silva, A. da Silva-Cunha, F. Behar-Cohen, E. Ayres, and R. L. Oréfice, "Biodegradation of polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, pp. 491–499, Apr. 2010.
- [31] J. L. M. R. K. R. P. W. Bruce Alberts, Alexander Johnson, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- [32] L. Bacáková, E. Filová, F. Rypáček, V. Svorčík, and V. Stary, "Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering.," *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, vol. 53 Suppl 1, pp. S35–45, Jan. 2004.
- [33] L. Li, Y. Qian, C. Jiang, Y. Lv, W. Liu, L. Zhong, K. Cai, S. Li, and L. Yang, "The use of hyaluronan to regulate protein adsorption and cell infiltration in nanofibrous scaffolds.," *Biomaterials*, vol. 33, pp. 3428–45, Apr. 2012.
- [34] M. Gardel and U. Schwarz, "Cell-substrate interactions.," *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal*, vol. 22, p. 190301, May 2010.
- [35] R. Horwitz and D. Webb, "Cell migration.," *Current biology : CB*, vol. 13, pp. R756–9, Sept. 2003.
- [36] CMC, "Cell migration gateway," October 2012.
- [37] P. Friedl and K. Wolf, "Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process.," *Cancer metastasis reviews*, vol. 28, pp. 129–35, June 2009.

- [38] L. Lamalice, F. Le Boeuf, and J. Huot, “Endothelial cell migration during angiogenesis,” *Circulation research*, vol. 100, pp. 782–94, Mar. 2007.
- [39] J. V. Small, T. Stradal, E. Vignal, and K. Rottner, “The lamellipodium: where motility begins,” *Trends in cell biology*, vol. 12, pp. 112–20, Mar. 2002.
- [40] P. Uttayarat, M. Chen, M. Li, F. D. Allen, R. J. Composto, and P. I. Leikes, “Microtopography and flow modulate the direction of endothelial cell migration,” *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 294, pp. H1027–35, Feb. 2008.
- [41] J. L. Jainchill, S. a. Aaronson, and G. J. Todaro, “Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells,” *Journal of virology*, vol. 4, pp. 549–53, Nov. 1969.
- [42] A. Calado, U. Kutay, U. W. E. Kühn, and E. Wahle, “Deciphering the cellular pathway for transport of poly (A) -binding protein II . Deciphering the cellular pathway for transport of poly (A) -binding protein II,” *Spring*, pp. 245–256, 2000.
- [43] E. Meijering, O. Dzyubachyk, and I. Smal, “Methods for cell and particle tracking,” *Methods in enzymology*, vol. 504, pp. 183–200, Jan. 2012.
- [44] M. Risbud, a. Hardikar, and R. Bhonde, “Growth modulation of fibroblasts by chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel: implications for wound management?,” *Journal of biosciences*, vol. 25, pp. 25–31, Mar. 2000.
- [45] N. Grover and H. Singh, “Growth of 3T3 fibroblast on collagen immobilized poly (ethylene terephthalate) fabric,” *Growth (Lakeland)*, vol. 35, no. September, pp. 228–236, 2010.

Apêndice A: Descongelamento das células e Primeira sementeira

O meio de cultura celular foi obtido adicionando Soro Fetal Bovino (FBS) e antibiótico (Penicilina + Estreptomicina) a meio DMEM + GlutaMax de modo a ter uma constituição final de 10% de FBS, 1% de antibiótico e 89% de meio DMEM em volume.

Descongelamento das células e Sementeira no frasco de cultura:

1. A alíquota das células da linhagem 3T3 foi retirada da arca congeladora, onde se encontrava armazenada a -80°C , e colocada em banho-maria a 37°C até descongelar;
2. Foram colocados 5 ml de meio, previamente aquecido em banho-maria a 37°C , num frasco de cultura T25;
3. O conteúdo da alíquota foi pipetado e imerso cuidadosamente nos 5 ml de meio do frasco T25;
4. O frasco de cultura foi colocado na estufa (37°C , 5% CO_2) até ao dia seguinte;
5. No dia seguinte, as células encontram-se bem aderidas ao frasco de cultura. O meio foi aspirado com o cuidado de não arrastar células aderidas e foi colocado novo meio, previamente aquecido em banho-maria a 37°C ;
6. O frasco de cultura volta a ser colocado na estufa até ao dia seguinte.

A troca do meio de cultura passadas 24h da sementeira é necessária devido à constituição do meio de congelamento das células contido na alíquota. Um dos seus componentes, o DMSO, é tóxico para as células e não deverá existir no meio durante períodos longos de cultura celular. Esta troca de meio também deverá remover do frasco as células que se encontravam mortas ou que morreram por não conseguirem aderir.

Apêndice B: Esterilização e Sementeira das células nas amostras e controlos

Esterilização:

1. Imersão das amostras e controlos em Etanol 70% dentro dos poços da placa multipoços (ou da caixa de petri) durante pelo menos 10 minutos;
2. Duas lavagens com PBS;
3. Uma lavagem com água Ultrapura;
4. Irradiação com Ultra Violeta expondo as placas multipoços (ou as caixas de petri) sem tampa à lâmpada UV da câmara de fluxo laminar durante 45 minutos.

As lavagens consistem em adicionar 0.5 ml a cada poço da placa multipoços que contenha amostras ou controlos (ou 2 ml no caso da esterilização de caixas de petri), esperar pelo menos cinco minutos e aspirar.

Após ver as células ao microscópio foi realizado o seguinte protocolo:

1. Remoção do meio do frasco de cultura;
2. Duas lavagens com PBS que consistem em pipetar 5 ml de PBS para o frasco de cultura e aspirar;
3. Adição de 250 μ l de Trypsina deixando actuar;
4. Adição de 5 ml de meio de cultura;
5. Preenchimento de uma câmara do hemocítmetro utilizando uma pipeta de Pasteur com as células suspensas no meio de cultura;
6. Contagem celular, recorrendo ao hemocítmetro, e respectiva estimativa;
7. Com o objectivo de semear ≈ 30.000 células/poço, é realizada a diluição necessária e sementeira na placa de cultura;
8. A placa é, por último, colocada na estufa (37°C, 5% CO₂).

Ao semear as células: As pipetagens da suspensão de células para os poços de cultura foram realizadas sempre após ressuspensão das células, inserindo e expelindo o líquido de cultura com uma pipeta, de modo a homogeneizar a distribuição de células no meio. Tendo isto em conta, no passo 7 da sementeira, a diluição é realizada de modo a obter 1 ml a mais no volume total a distribuir pelos poços, caso algum volume seja perdido nos processos de ressuspensão.

Apêndice C: Fixação e Marcação das células para observação com Fluorescência

1. A placa de 48 poços a fixar foi retirada da estufa e vista ao microscópio óptico nos poços dos controlos e da cola de vácuo;
 2. Foram descongelados 24 ml de Formaldeído (PFA 4%) e realizada uma diluição para PFA 2%: 7 ml de PFA 4% + 7 ml de PBS;
 3. O meio de cultura foi retirado dos 24 poços e foi pipetado 0.5 ml de PFA 2% para cada poço deixando actuar durante 1 hora à temperatura ambiente;
 4. Decorrida a 1h, o PFA foi removido e foram realizadas 3 lavagens com PBS, nas mesmas condições das lavagens anteriores;
 5. De seguida foram colocados 0.5 ml de Triton X-100 (0.2% em PBS) em cada poço, deixando permeabilizar durante 30 min;
 6. Após este tempo, foram realizadas mais 3 lavagens dos poços com PBS e o descongelamento de 14 ml de BSA (Bovine Serum Albumin);
 7. Foram, depois, diluídos 25 μ l de Faloidina em 2.5 ml de BSA (2% em PBS) de modo a obter uma proporção de 1:10. Destes, foram pipetadas gotas de 100 μ l por cima de Parafilme que se encontrava colocado por cima de papel absorvente previamente humedecido dentro de uma caixa;
 8. As amostras e as lamelas foram retiradas da placa de poços e colocadas por cima das gotas, de modo a que o lado das amostras e lamelas com as células estivesse voltado para o líquido;
 9. Foram colocados mais dois rolos de papel absorvente humedecido dentro da caixa afastados das amostras. A caixa foi revestida com folha de Alumínio para proteger da luz, fechada, selada com Parafilme e armazenada no frigorífico até ao dia seguinte (câmara húmida);
 10. No dia seguinte, as amostras foram colocadas em 6 placas de 4 poços e lavadas 3 vezes com PBS;
 11. Por último, foram colocados grupos de 4 amostras em 4 gotas de 100 μ l de DAPI reutilizadas para todos os grupos. Cada grupo permaneceu entre 30s a 1min em contacto com as gotas de DAPI e novamente colocadas nas placas de 4 poços e lavadas 2 vezes com PBS.
- Finalizado o processo de fixação e marcação das células, as amostras foram imersas numa solução de PBS e Azida, colocadas numa caixa escura e armazenadas no frigorífico até ao dia seguinte para observação por microscopia de fluorescência.

Apêndice D: Reagente PrestoBlueTM

O Protocolo de utilização do reagente PrestoBlue foi realizado com as células vivas após um dia em cultura, garantindo a sua adesão. Após a utilização deste protocolo as células foram fixadas.

1. Foram adicionados 50 μL de reagente ao meio de cada poço da placa de cultura de 48 poços;
2. O reagente foi incubado colocando a placa de cultura novamente na estufa (37° , 5%CO₂) durante pelo menos uma hora;
3. De cada poço da placa de cultura, foram pipetados três vezes 100 μL de meio (contendo o reagente dissolvido) para três poços de uma placa de 96 poços;
4. A placa de 96 foi sujeita a medições de Absorvância. No equipamento utilizado são medidas as absorvâncias de cada poço nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm fornecendo o resultado da sua subtração.