



Ana Luísa Pires Marques

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de Suportes Biodegradáveis para Regeneração do Tecido Neuronal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Co-Orientadores: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL

Adelaide Fernandes, PhD, FF-UL

Maria Alexandra Brito, PhD, FF-UL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor João Paulo Lança Pinto Casquilho

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Moura Santos

Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Prof. Doutora Maria Alexandra de Oliveira Silva Braga Pedreira de Brito



Ana Luísa Pires Marques

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Desenvolvimento de Suportes Biodegradáveis para Regeneração do Tecido Neuronal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, PhD, FCT-UNL

Co-Orientadores: Jorge Carvalho Silva, PhD, FCT-UNL

Adelaide Fernandes, PhD, FF-UL

Maria Alexandra Brito, PhD, FF-UL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor João Paulo Lança Pinto Casquilho

Arguente: Prof. Doutora Ana Isabel Moura Santos

Vogais: Prof. Doutora Célia Maria Reis Henriques

Prof. Doutora Maria Alexandra de Oliveira Silva Braga Pedreira de Brito

Copyright

Copyright© - Todos os direitos reservados. Ana Luísa Pires Marques; Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Desenvolvimento de Suportes Biodegradáveis para Regeneração do Tecido Neuronal.

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

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.

Marie Curie (1867-1934)

Em primeiro lugar quero agradecer, naturalmente, aos meus Orientadores.

À Professora Célia Henriques, um obrigada muito especial, pela sua imensa dedicação, excelente orientação e constante disponibilidade demonstrada ao longo de todo o semestre, desde o primeiro contacto. Desde as idas a Lisboa, às reuniões semanais ao longo do ano, a sua valiosa ajuda, comentários, conselhos e apoio foram, sem dúvida, decisivos e fundamentais. Muito Obrigada!

Ao Professor Jorge Carvalho Silva, um muitíssimo obrigada igualmente pela sua dedicação, orientação e imensa disponibilidade prestada ao longo do semestre. A sua constante calma e boa disposição, foram e são aspectos fundamentais para a orientação e decorrer de um bom trabalho.

À Professora Adelaide Fernandes, um agradecimento também muito especial, pela sua entrega e disponibilidade para me acompanhar ao longo de todo o procedimento referente à cultura celular. Por todos os ensinamentos, conselhos, pelo tempo dedicado e todo o esforço empre- gue durante os tempos passados no CPM. As suas sugestões foram, sem dúvida, fundamen- tais para a boa continuação do trabalho. Aprendi imenso no que se refere a cultura celular e à Professora Adelaide o devo. Muito Obrigada!

À Professora Alexandra Brito, agradeço a sua preocupação e disponibilidade para revisão bi- bliográfica de conteúdos referentes a neurobiologia.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que tornaram cada dia num dia diferente. Um muito obrigada Mafalda Fernandes, Joana Fonseca, Rita Rosa e Susana Gomes pelos grandes mo- mentos partilhados no GREAT; João Martins pelos grandes risos que proporcionaste ao longo do semestre, e posso agora aqui dizer que “isso é que foi fundamental!”.

A todos os meus amigos Biomédicos, que fizeram destes 5 anos de faculdade tempos inesque- cíveis, cultivando-se amizades duradouras que certamente permanecerão ao longo do tempo. Aos futuros Engenheiros Biomédicos da FCT-UNL, obrigada.

Aos meus Pais, um obrigada não me parece o suficiente para todos os momentos que me pro- porcionaram, pelo apoio sempre constante, intemporal e incondicional que desde sempre de- monstraram perante cada opção minha. A eles lhes devo tudo o que sou. Um MUITO obrigada por tudo. Igualmente, ao meu Irmão e à minha “Mana emprestada”, por ver neles um exemplo a seguir. E é claro, por trazerem ao mundo o pequeno Tomás, perfeita imagem da alegria e inspi- ração.

“Last but not the least”... Ricardo, agradeço a paciência e o carinho que sempre demonstraste em todos os momentos. Por todo o apoio demonstrado, pela palavra certa que sempre soubes-

te dizer a cada momento. Por ouvires e sempre saberes o que fazer e dizer. Por seres o grande amigo que és. Obrigada!

Disruption of central nervous system tissues originates a series of secondary changes that prevent the restoration of neurologic functions. In the treatment of these lesions it is important to reduce inflammation, prevent cell death and promote tissue regeneration.

In this work, biodegradable scaffolds were developed to support neuronal regeneration. The electrospinning technique was used to produce scaffolds with submicrometric fibers from poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and chitosan (CS) solutions in concentrated acetic acid.

Scaffolds with randomly oriented and aligned fibers were produced. The latter was achieved by using a rotating cylindrical collector. With the Fast Fourier Transform, SEM images were analyzed to see the effect of rotating speed on fiber alignment. The scaffolds' hydrophilicity was evaluated by measuring the contact angle.

Primary hippocampal neurons were prepared from fetuses of female Murganho CD1 in random and aligned fibers scaffolds, coated and uncoated with poly-d-lysine and laminin (PDL/Lam).

The CS aligned fiber scaffold without PDL/Lam revealed better results regarding the axonal growth. The alignment determines the direction of axonal growth and promotes a better development (higher average lengths). In general, the presence of PDL/Lam improves the cellular adhesion.

Keywords: Electrospinning, aligned fibers, hippocampal neurons, CNS injury

A disrupção dos tecidos do sistema nervoso central desencadeia um conjunto de alterações secundárias que impedem o restabelecimento das funções neurológicas. No tratamento destas lesões é importante reduzir a inflamação, prevenir a morte celular e promover a regeneração dos tecidos.

Neste trabalho desenvolveram-se matrizes biodegradáveis destinadas a suportar a regeneração neuronal. Utilizou-se a técnica de electrofiação para produzir matrizes de fibras submicro-métricas a partir de soluções de poli(ϵ -caprolactona) e de quitosano (CS), em ácido acético concentrado.

Produziram-se matrizes com fibras orientadas aleatoriamente e, utilizando um colector cilíndrico rotatório, matrizes de fibras alinhadas. A partir da transformada de Fourier de imagens de SEM, estudou-se o efeito da velocidade de rotação no alinhamento das fibras. A hidrofiliçidade das matrizes foi avaliada pela medição dos ângulos de contacto.

Foram realizadas culturas primárias de células do hipocampo de fetos de fêmeas *Murghano CD1* em matrizes de fibras alinhadas e desalinhadas, com e sem revestimento de poli-D-lisina e laminina (PDL/Lam).

A matriz de fibras alinhadas de CS sem PDL/lam apresentou os melhores resultados quanto ao crescimento do axónio. O alinhamento determina a direcção do crescimento do axónio bem como um maior desenvolvimento (maior média de comprimentos). Em geral, a presença de PDL/Lam melhora a adesão celular.

Palavras-chave: electrofiação, fibras alinhadas, neurónios do hipocampo, lesão no SNC

1.	Introdução.....	2
2.	Sistema Nervoso.....	6
2.1	Divisão e Funções.....	6
2.2	Neuroglia.....	10
2.3	Estrutura e constituição de um neurónio.....	11
2.4	Potencial de acção.....	13
2.5	Desenvolvimento de neurónios.....	15
2.6	Citoesqueleto dos neurónios.....	17
2.7	Transporte axonal.....	18
2.8	Engenharia de tecidos e regeneração do tecido neuronal.....	18
3.	Engenharia de Tecidos.....	22
3.1	Polímeros.....	23
3.1.1	Poli (ϵ -caprolactona).....	24
3.1.2	Quitosano.....	25
3.1.3	PEO – Poli(óxido de etileno).....	26
3.2	Electrofiação – Método de Produção das Matrizes.....	27
3.2.1	Processo.....	28
3.2.2	Parâmetros de electrofiação.....	30
4.	Materiais e Métodos.....	34
4.1	Electrofiação.....	34
4.2	Produção das matrizes poliméricas.....	36
4.2.1	Matrizes de PCL.....	36
4.2.2	Matrizes de CS.....	36
4.2.3	Matrizes de PCL e CS.....	37
4.3	Medição do ângulo de contacto.....	37
4.4	Análise da Morfologia por imagens SEM.....	38
4.4.1	Diâmetro das fibras.....	39
4.4.2	Orientação das fibras.....	39
4.5	Densidade aparente e porosidade.....	40
4.6	Cultura primária de células do hipocampo.....	41

4.6.1	Preparação das matrizes para a cultura	41
4.6.2	Obtenção das células do hipocampo.....	42
4.7	Observação morfológica das células.....	42
4.7.1	Análise citoquímica.....	42
4.7.2	Avaliação do desenvolvimento axonal.....	43
4.7.3	Microscopia electrónica.....	43
5.	Resultados e Discussão	46
5.1	Parâmetros para a obtenção das matrizes	46
5.1.1	Matrizes de PCL	46
5.1.2	Matrizes de CS	49
5.1.3	Matrizes de PCL/CS.....	52
5.2	Análise da morfologia por imagens SEM.....	52
5.2.1	Avaliação do diâmetro das fibras.....	52
5.2.2	Avaliação do alinhamento das fibras	54
5.3	Densidade e porosidade das matrizes.....	58
5.4	Ângulos de contacto	58
5.5	Análise do desenvolvimento da cultura primária de neurónios nas matrizes de PCL, CS e PCL/CS.	60
5.5.1	Análise da adesão celular às matrizes poliméricas.....	60
5.5.2	Análise do desenvolvimento celular nas matrizes poliméricas	63
5.5.2.1	Análise da extensão do axónio tendo em conta a constituição polimérica das matrizes.....	67
5.5.2.2	Análise da extensão do axónio tendo em conta o alinhamento das fibras nas matrizes.....	68
5.5.2.3	Análise do efeito do revestimento com PDL/Lam na extensão do axónio	69
6.	Conclusão	72
6.1	Perspectivas futuras	73
7.	Bibliografia	75

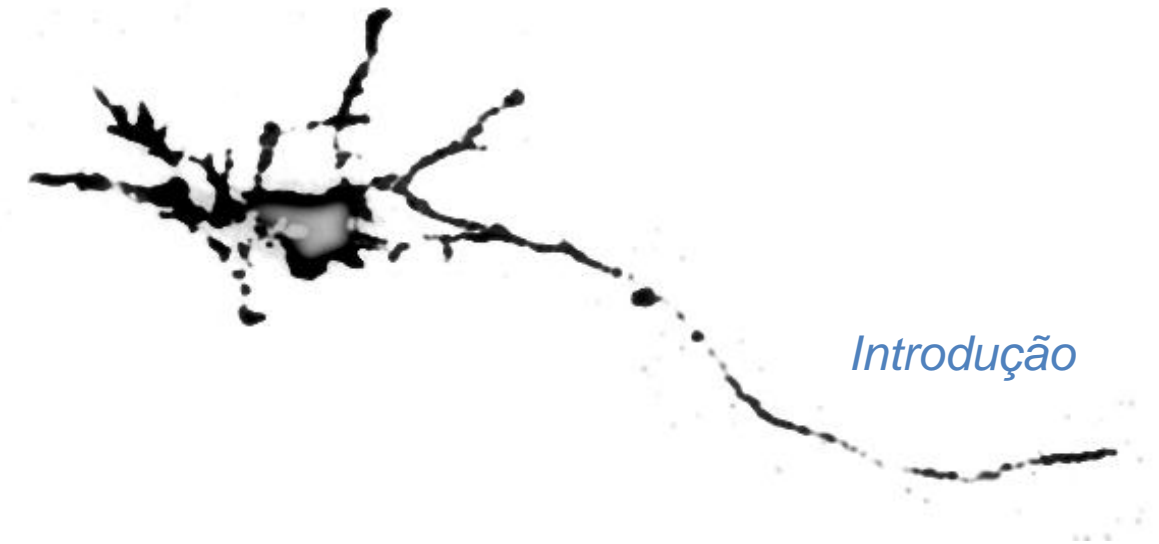
Figura 2.1 - Figura ilustrativa do sistema nervoso.....	6
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da organização e comunicação do sistema nervoso.	7
Figura 2.3 - Esquemas de comunicação entre o SNC e o SNP autónomo e entre o SNC e o SNP somático.....	8
Figura 2.4 - Localização dos constituintes do sistema límbico.....	9
Figura 2.5 - Neuroglia do sistema nervoso central.	11
Figura 2.6 - Esquema geral de um neurónio multipolar.....	12
Figura 2.7 - Distribuição dos iões dentro e fora da membrana plasmática dos neurónios.	14
Figura 2.8 - Estrutura de uma sinapse química.....	15
Figura 2.9 - Esquema ilustrativo do desenvolvimento de um neurónio embrionário ao longo do tempo, em cultura.	16
Figura 2.10 - Esquema do ciclo celular de uma célula.	19
Figura 3.1 - Esquema da ϵ -caprolactona.....	24
Figura 3.2 - Unidades repetitivas de a) N-acetilglucosamina; b) N-glucosamina; c) Estrutura da quitina parcialmente desacetilada, com grau de desacetilação GD.	26
Figura 3.3 - Estrutura química do POE.	27
Figura 3.4 - Esquema geral do processo de electrofiação utilizando um colector plano.....	29
Figura 3.5 - Esquema geral do processo de electrofiação utilizando um cilindro como colector rotatório.	30
Figura 4.1 - Fotografia da montagem de electrofiação com um colector plano.	34
Figura 4.2 - Montagem de electrofiação com um colector cilíndrico rotatório.	34
Figura 4.3 - Colector plano para colocação de lamelas.....	35
Figura 4.4 - Esquema ilustrativo da medição da hidrofiliidade de uma superfície, através da medição do ângulo de contacto.....	37
Figura 4.5 - Goniómetro KSV Contact Angle Meter - Cam 100, utilizado para as medições do ângulo de contacto.....	38
Figura 4.6 - JEOL JSM-7001F Scanning Electron Microscope.	38
Figura 5.1 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 20%PCL em ácido acético glacial.	46
Figura 5.2 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 23%PCL em 90%AcAc.....	47
Figura 5.3 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 23%PCL em 95%AcAc.....	48
Figura 5.4 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de CS.	49
Figura 5.5 - Efeito do fluxo na morfologia das fibras.....	50
Figura 5.6 - Influência da massa molar do PEO das fibras produzidas por electrofiação	51
Figura 5.7 - Imagens de SEM das matrizes e respectivos histogramas relativos aos diâmetros das fibras.....	53
Figura 5.8 - Avaliação do grau de alinhamento das fibras	55

Figura 5.9 - Análise de Fourier das fibras desalinhadas.....	56
Figura 5.10 - Espectros de Fourier em função da velocidade de rotação.	57
Figura 5.11 - Resumo dos ensaios dos ângulos de contacto.....	59
Figura 5.12 - Determinação do número de células cultivadas nas matrizes, ao 3ºdiv.	61
Figura 5.13 - Imagens de SEM obtidas para os 3 tipos de matrizes	62
Figura 5.14 - Células neuronais cultivadas em matrizes de PCL.....	64
Figura 5.15 - Células neuronais cultivadas em matrizes de CS.....	65
Figura 5.16 - Células cultivadas na matriz com fibras desalinhadas de CS.	65
Figura 5.17 - Células neuronais cultivadas em matrizes de PCL/CS.	66
Figura 5.18 - Células cultivadas na matriz com fibras alinhadas de PCL/CS	67
Figura 5.19 - Valores médios do comprimento do axónio para as matrizes com diferentes polímeros na sua constituição.	68
Figura 5.20 - Comparação do comprimento dos axónios em matrizes com fibras alinhadas e desalinhadas.....	69
Figura 5.21 - Efeito do revestimento com PDL/lam no crescimento dos axónios, em fibras alinhadas e desalinhadas.	69
Figura 5.22 - Células neuronais cultivadas na matriz de CS com fibras alinhadas.....	70

Tabela 5.1 - Diâmetros médios das fibras desalinhas e alinhadas para os 3 tipos de matriz.....	52
Tabela 5.2 - Valores obtidos para a densidade aparente e porosidade das matrizes de PCL.	58
Tabela 5.3 - Valores médios dos ângulos de contacto para as matrizes poliméricas.....	59

AcAc	Ácido acético
BSA	Albumina de Soro Bovino (do inglês: <i>Bovine Serum Albumine</i>)
CMS	Meio de cultura suplementado (do inglês: <i>Culture medium supplemented</i>)
CS	Quitosano (do inglês: <i>Chitosan</i>)
DIVs	do inglês: <i>Days in Vitro</i>
EGTA	do inglês: <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EMEM	do inglês: <i>Eagles minimal essential medium</i>
FCS	do inglês: <i>Fetal calf serum</i>
FFT	Transformada Rápida de Fourier (do inglês: <i>Fast Fourier Transform</i>)
HBSS	do inglês: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	(<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
MAP	do inglês: <i>Microtubule Associated Protein</i>
PBS	do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>
PCL	Poli(ϵ – caprolactona) (do inglês: <i>Poly(ϵ-Caprolactone)</i>)
PDL/Lam	Poli-D-Lisina e Laminina
PEG	Poli(etileno glicol) (do inglês: <i>Poly(ethylene glycol)</i>)
PEO	Poli(óxido de etileno) (do inglês: <i>Poly(ethylene oxide)</i>)
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
POE	do inglês: <i>Poly(oxyethylene)</i>
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RPM	Rotações por minuto
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (do inglês: <i>Scanning Electron Microscope</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TA	Temperatura Ambiente
UV	Raios Ultra Violeta (do inglês: <i>Ultra Violet</i>)

Capítulo 1



Introdução

1. Introdução

O sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos adultos não recupera espontaneamente de uma lesão e, como resultado, os pacientes sofrem, muitas vezes, de perda da sensibilidade ou da função motora. Este facto motiva o desenvolvimento de novas terapias para além do enxerto [1] [2].

Os danos causados por traumatismos do SNC resultam em morte celular e conduzem a uma resposta do sistema neuronal hostil à regeneração que leva à formação de uma cavidade e de uma cicatriz glial. Os principais objectivos de um tratamento eficaz serão, então, reduzir a inflamação e prevenir a morte secundária de células, bem como promover a substituição de neurónios danificados, fornecendo factores e substratos apropriados ao crescimento de neurites para que a estrutura original venha a ser regenerada [3] [4].

A engenharia de tecidos avança com recursos aplicáveis na área da medicina regenerativa, através do desenvolvimento de matrizes (*scaffolds*) sintéticas capazes de suportar e regular o desenvolvimento celular e a regeneração dos tecidos [5].

Estas matrizes devem ter propriedades que permitam uma interacção construtiva com o sistema biológico – devem ser biocompatíveis, ter uma biodegradabilidade controlada e da qual resultem produtos não tóxicos, causar uma reacção inflamatória mínima (nula de preferência) e possuir porosidade adequada à revascularização e migração celular. Também as suas propriedades mecânicas se devem assemelhar às do tecido extracelular [6].

Tendo como finalidade a regeneração do tecido neuronal, biomateriais poliméricos têm vindo a ser estudados tanto *in vitro* como *in vivo*. É grande a gama de polímeros disponíveis com propriedades interessantes tendo em conta as características exigidas. Os polímeros são ainda passíveis de ser alterados quimicamente, fáceis de processar e económicos [6].

Entre os estudos publicados neste âmbito têm sido investigadas matrizes de nanofibras obtidas por electrospinning (em inglês, *electrospinning*) destinadas à regeneração tanto do SNC como do sistema nervoso periférico (SNP). Vários materiais e graus de alinhamento das fibras podem ser considerados usando esta técnica. Por exemplo, Prabhakaran et. al. (2008) utilizaram matrizes de nanofibras de poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e PCL/Quitosano (CS) onde estudaram o crescimento de células do sistema nervoso periférico, demonstrando que a combinação dos diferentes polímeros pode ser preferível [7].

A viabilidade das células do SNC em substratos de CS foi estudada por Qianru et.al. (2009). Células embrionárias de ratos foram cultivadas em fibras obtidas pela técnica de fiação húmida, não demonstrando qualquer efeito citotóxico no fenótipo ou nas funções celulares. Estas membranas revelaram assim ter potencial para aplicação na regeneração do SNC [2].

A influência da morfologia da membrana foi testada tendo em conta diversas estruturas com fibras desalinhasadas, alinhadas ou em rede [8] [9]. Foi demonstrado que factores como a ade-

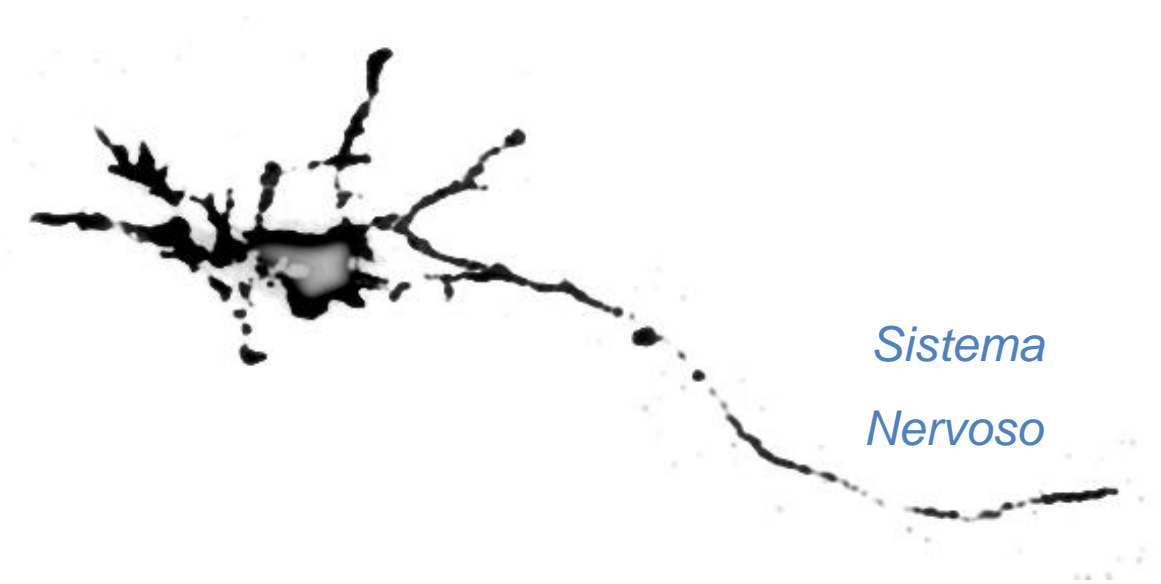
são, proliferação, migração e diferenciação celular são influenciados pelo alinhamento das fibras, pelo seu diâmetro, densidade, carga superficial e capacidade de libertação/adsorção de proteínas [1] [3] [9] [10].

O principal objectivo deste projecto foi o desenvolvimento de matrizes com propriedades que permitam a adesão, desenvolvimento e crescimento de células neuronais, com vista à regeneração do tecido neuronal. Desenvolveram-se matrizes com fibras desalinhadas e alinhadas, prevendo-se que estas últimas contribuíssem para a condução do crescimento do axónio ao longo da direcção de alinhamento, providenciando uma melhor e mais rápida conexão entre as extremidades dos tecidos lesados. As matrizes foram produzidas usando polímeros biocompatíveis: PCL e CS. Consideraram-se matrizes de PCL, CS e de ambos os polímeros.

O primeiro passo do trabalho foi determinar os parâmetros para a produção das matrizes pela técnica de electrofição com diferentes graus de alinhamento. Uma vez produzidas as matrizes, procedeu-se à cultura primária de células do hipocampo nas mesmas. Posteriormente realizou-se a análise citoquímica das células cultivadas e procedeu-se à identificação da melhor estrutura para a adesão e desenvolvimento das células, tendo em conta a sua constituição e morfologia. Considerou-se ainda o efeito do revestimento das matrizes com Poli-D-Lisina e Laminina (PDL/Lam).

O desenvolvimento das células foi assim avaliado em 12 substratos: 3 constituições poliméricas, 2 alinhamentos (fibras desalinhadas e maioritariamente alinhadas) e com e sem revestimento de PDL/Lam.

Capítulo 2



*Sistema
Nervoso*

2. Sistema Nervoso

2.1 Divisão e Funções

O sistema nervoso é uma rede de comunicação complexa que se estende a todo o corpo (ver Figura 2.1).

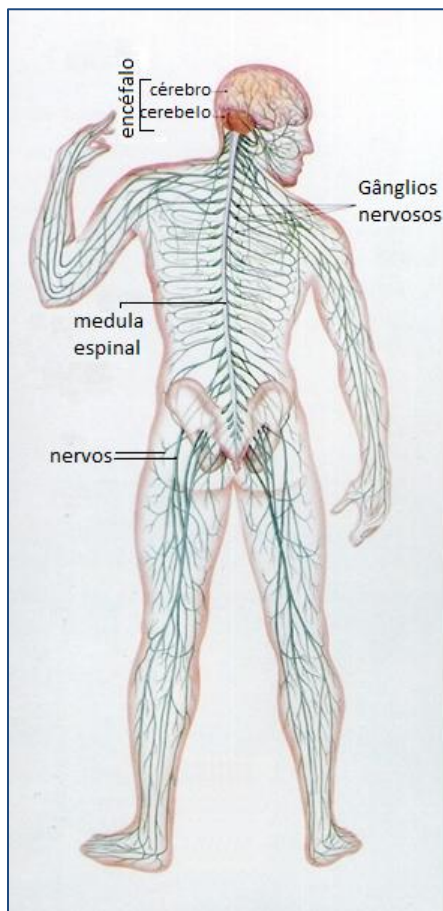


Figura 2.1 - Figura ilustrativa do sistema nervoso. *Colecção didáctica – O corpo humano – Geomapas editora de mapas e guias Ltda.*

Contém duas grandes sub-divisões anatómicas: SNC que consiste no encéfalo e medula espinal, protegidos pelo crânio e coluna vertebral, respectivamente; e SNP composto por nervos e gânglios [11].

Tem como função receber os estímulos internos e externos, processá-los e transmiti-los a diversas zonas do corpo.

O SNC comunica com o SNP (ver Figura 2.2) que se divide em sistema nervoso periférico visceral ou autónomo e sistema periférico somático ou voluntário (ver Figura 2.3)

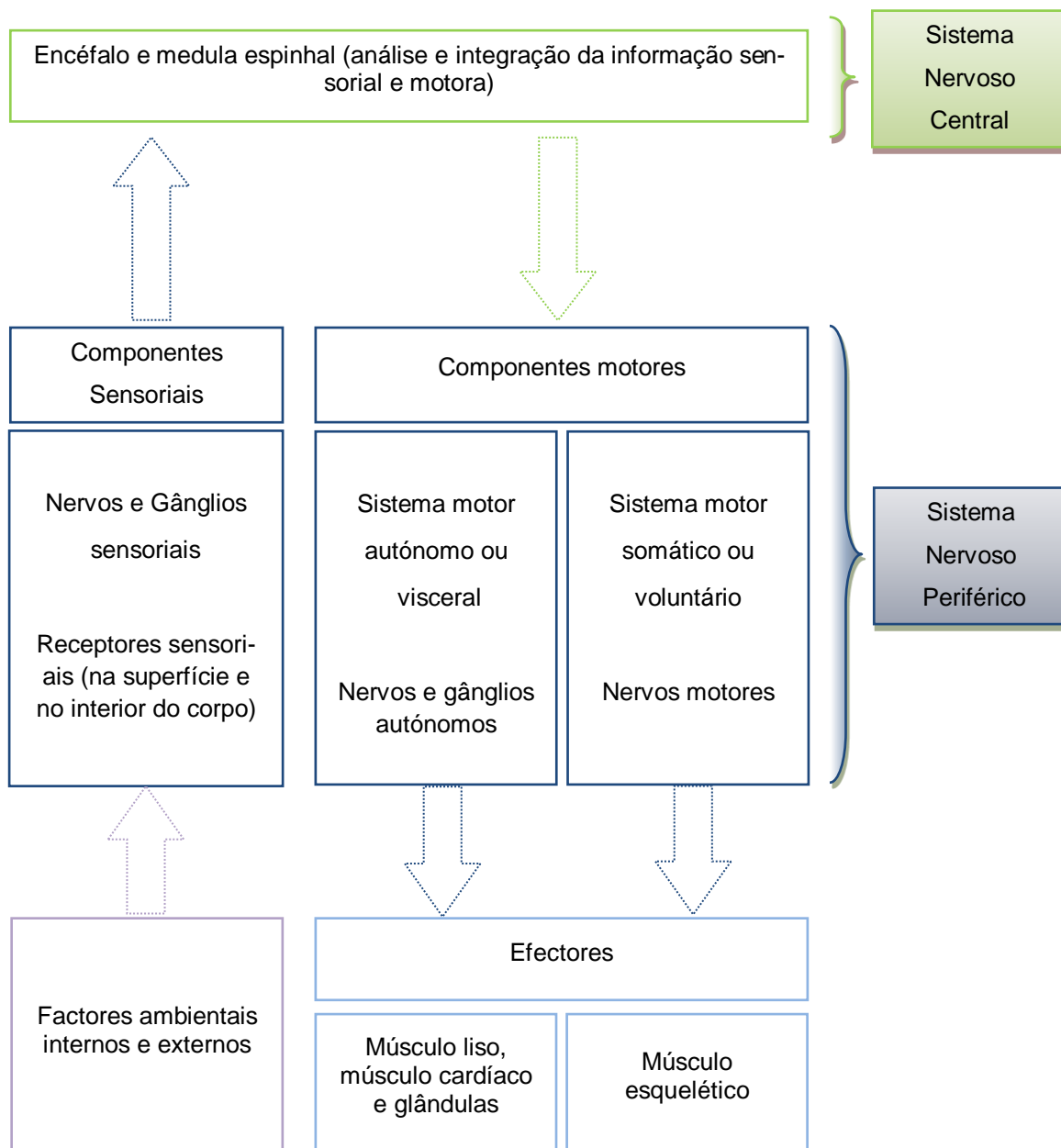


Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da organização e comunicação do sistema nervoso. As setas indicam o “sentido” do envio de informação (sinais eléctricos). Adaptado de Purves D. et.al. 2004 [12].

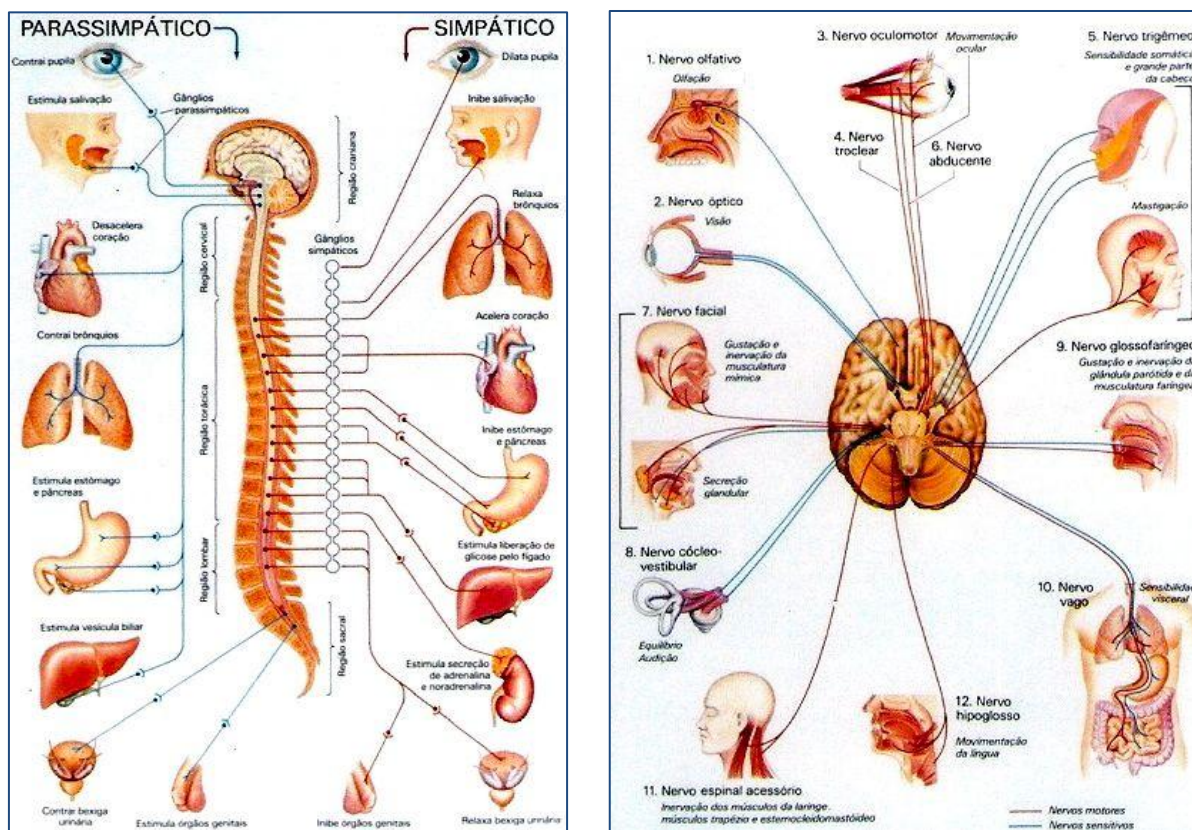


Figura 2.3 - Esquemas de comunicação entre o SNC e o SNP autônomo (à esquerda) e entre o SNC e o SNP somático (à direita). *Colecção didáctica – O corpo humano – Geomapas editora de mapas e guias Ltda.*

Normalmente consideram-se como unidades básicas do encéfalo o tronco encefálico, o cerebelo, o diencefalo e os dois hemisférios cerebrais [12].

Nos lobos temporais do córtex cerebral encontra-se presente o sistema límbico (ver Figura 2.4), responsável pelo olfacto, comportamento emocional e pela memória. De entre os seus constituintes, o hipocampo é uma das estruturas relacionadas com os processos de aprendizagem e memória. Curiosamente, na doença de Alzheimer, o hipocampo é uma das regiões afectadas [11] [12].

Neste trabalho foram usadas células embrionárias do hipocampo de roedores (*Murganho CD1*).

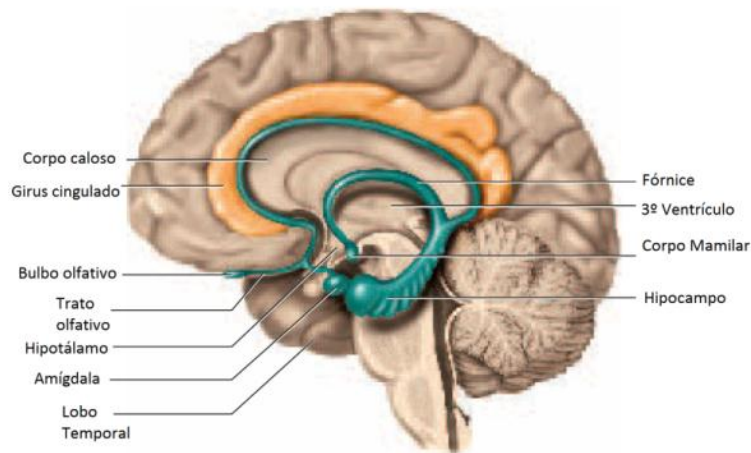


Figura 2.4 - Localização dos constituintes do sistema límbico, inserido no lobo temporal. Retirado de *Saladin K., 2003* [11].

Os nervos transportam os sinais eléctricos emergentes do SNC através dos orifícios do crânio e coluna vertebral para os vários órgãos e vice-versa. A comunicação ao longo dos nervos é realizada pelas células nervosas – os neurónios. Estes têm três propriedades fisiológicas fundamentais necessárias à sua função: excitabilidade – devem responder a estímulos; condutividade – os estímulos levam à produção de sinais eléctricos que rapidamente se propagam pela célula; secreção – libertação de neurotransmissores que ocorre quando o sinal eléctrico atinge a extremidade final da célula e que irão estimular a próxima célula.

De acordo com a sua função os neurónios estão divididos em 3 classes:

- ➔ Neurónios sensoriais ou aferentes – detectam estímulos como a luz, calor ou pressão, transmitindo informação para o SNC. Podem ter origem em quase todos os órgãos do corpo e terminam no SNC.
- ➔ Interneurónios ou neurónios de associação – situam-se apenas no SNC. Recebem os sinais provenientes dos neurónios sensoriais processando-os, determinando o modo do corpo responder ao estímulo.
- ➔ Neurónios motores ou eferentes – enviam os sinais para os músculos e glândulas. Transportam os estímulos da resposta do corpo. O seu corpo celular encontra-se no SNC e os seus axónios fora dele. Existem diferentes tipos de neurónios motores de acordo com o alvo [11].

Assim, de acordo com a sua função, o sistema nervoso está dividido em sistema sensorial, sistema associativo e sistema motor.

2.2 Neuroglia

Os neurónios não são as únicas células constituintes do sistema nervoso, estando até presentes em menor número em comparação com as outras células designadas colectivamente por neuroglia. Trata-se de células de suporte que protegem os neurónios e ajudam à sua função. No feto, as células gliais formam uma matriz que orienta os neurónios imaturos na sua migração para os locais de destino [11] [13] [14].

Da neuroglia fazem parte seis tipos celulares, cada um com uma função diferente. Quatro destes tipos existem no SNC (ver Figura 2.5) :

→ Oligodendrócitos – contêm cerca de 15 ramificações, cada uma atingindo uma fibra nervosa, envolvendo-a em espiral, formando uma espécie de folha enrolada sobre si mesma, designada por folha de mielina. Estas células do SNC produtoras de mielina isolam assim a fibra nervosa do líquido extracelular e são responsáveis também pela manutenção da sua funcionalidade [11].

→ Astrócitos – são as células mais abundantes da neuroglia do SNC. Cobrem toda a superfície do cérebro e muitas regiões não-sinápticas¹ dos neurónios na matéria cinzenta do SNC. Formam um quadro de apoio para o tecido nervoso. As suas extensões ligam-se às células endoteliais dos capilares sanguíneos formando uma rede apertada. Estas junções contribuem para a barreira hematoencefálica que controla rigorosamente a entrada no encéfalo de substâncias provenientes da corrente sanguínea. Os astrócitos são capazes de converter a glicose do sangue em lactato, fornecendo-o aos neurónios como uma importante fonte de energia; segregam factores de crescimento que promovem o desenvolvimento dos neurónios e a formação de sinapses. Os astrócitos são igualmente capazes de comunicar electricamente com os neurónios, podendo influenciar a sinalização sináptica. Absorvem substâncias químicas em excesso do líquido extracelular que os neurónios libertam aquando da libertação de neurotransmissores. Caso ocorra algum dano no SNC, formam uma densa cicatriz de modo a evitar a propagação do dano neuronal [11] [14].

Os oligodendrócitos e os astrócitos constituem a macroglia.

→ Célulasependimárias – são células cubóides que compreendem a neuroglia epitelial, revestem as cavidades internas do cérebro e da medula espinhal. Produzem o líquido céfalo-raquidiano.

→ Microglia – são pequenos macrófagos que se desenvolvem a partir de células do sangue e fagocitam tecido nervoso morto, microorganismos e outras matérias que sejam estranhas.

Os outros dois tipos de células gliais ocorrem no SNP: células de Schwann (mielinizam os axónios) e as células satélite (rodeiam o corpo celular dos neurónios em gânglios do SNP) [11].

¹ Região sináptica – sinapse é uma região de contacto muito próximo entre a extremidade de um axónio e as dendrites de um neurónio vizinho ou a superfície de outras células.

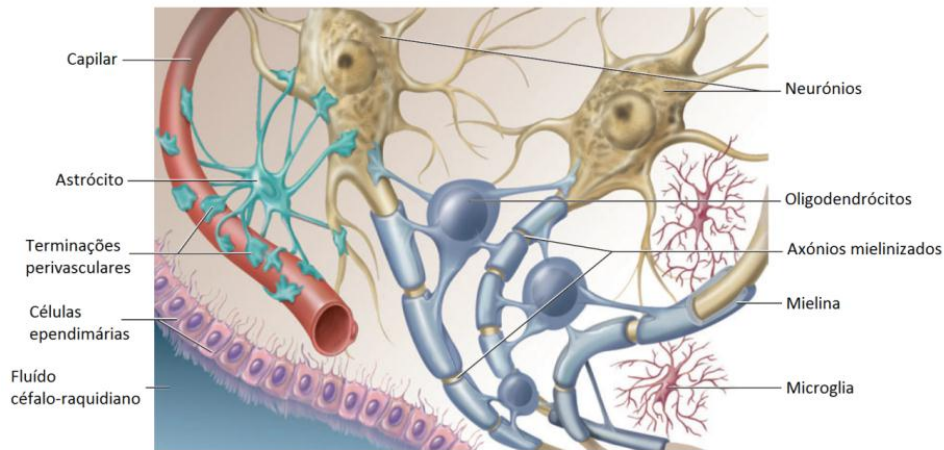


Figura 2.5 - Neuroglia do sistema nervoso central. Retirado de *Saladin K., 2003* [11].

2.3 Estrutura e constituição de um neurónio

O centro de controlo de um neurónio é denominado corpo celular ou pericário, podendo este ter dimensões entre 5 a 135 μm de diâmetro. Contém um núcleo central com um grande nucléolo. No seu citoplasma encontram-se outros organelos como mitocôndrias, lisossomas, complexo de Golgi, um extenso retículo endoplasmático rugoso (RER) e o citoesqueleto. A organização do citoesqueleto, composto por actina, tubulina e miosina, torna os neurónios distintos das outras células, uma vez que esta é crítica para a sua estabilidade e funcionamento. É aqui, no corpo celular, que a maior parte das proteínas necessárias aos neurónios são produzidas.

Os neurónios são distinguidos pela sua especialização na comunicação intercelular. Este atributo pode ser observado na sua morfologia, na organização específica dos componentes da membrana para a transmissão do sinal eléctrico, e na complexidade estrutural e funcional da transmissão de informação entre neurónios, as denominadas sinapses.

A ramificação dos neurónios é um atributo necessário à comunicação intercelular especializada. Como tal, o corpo celular dá origem ao crescimento de algumas protuberâncias denominadas dendrites (ou ramificações dendríticas). É através das dendrites que um neurónio recebe informação proveniente de outros neurónios. Alguns têm apenas uma dendrite, enquanto outros têm milhares. Quanto maior for a sua arborização dendrítica, mais informação pode receber de outras células (ver Figura 2.6) [11] [12] [13].

Do corpo celular tem também origem o axónio. Este é cilíndrico e menos ramificado em quase todo o seu comprimento, chegando a ter dimensões entre 1 a 20 μm de diâmetro e desde alguns milímetros até mais de 1 metro de comprimento. Pode, no entanto, dar origem a pequenos ramos denominados axónios colaterais. O seu citoplasma é denominado axoplasma e a sua membrana axolema. Cada neurónio tem apenas um axónio podendo, no entanto, não ter nenhum. Um axónio é especializado na rápida condução do impulso eléctrico para locais afastados do corpo celular, ou seja, em direcção à arborização terminal do neurónio – uma comple-

xa rede de ramificações, local que está em contacto com outros neurónios. Cada ponta existente nesta arborização tem o terminal pré-sináptico mais protuberante. No seu interior existem vesículas sinápticas contendo neurotransmissores necessários para a progressão do sinal eléctrico para outro neurónio, célula muscular ou glândula [11].

Os neurónios são classificados estruturalmente de acordo com o número de ramificações que emergem do corpo celular. Tem-se então:

- ➔ Neurónios multipolares – têm apenas um axónio e diversas dendrites; é o tipo de neurónio mais comum, sendo deste tipo a maioria dos neurónios do encéfalo e medula espinhal.
- ➔ Neurónios bipolares – têm apenas um axónio e uma dendrite; são exemplos as células olfactivas da cavidade nasal, alguns neurónios da retina e neurónios sensoriais do ouvido interno.
- ➔ Neurónios unipolares – têm apenas uma ramificação proveniente do corpo celular que se bifurca (em forma de T), originando um axónio e numa das suas extremidades desenvolvem-se dendrites. Uma vez que há apenas uma longa fibra nervosa, o sinal eléctrico não passa pelo corpo celular. São neurónios que transportam sinais sensoriais para a medula espinhal.
- ➔ Neurónios anaxónicos – têm múltiplas dendrites e nenhum axónio. Alguns neurónios anaxónicos encontram-se no cérebro e retina.

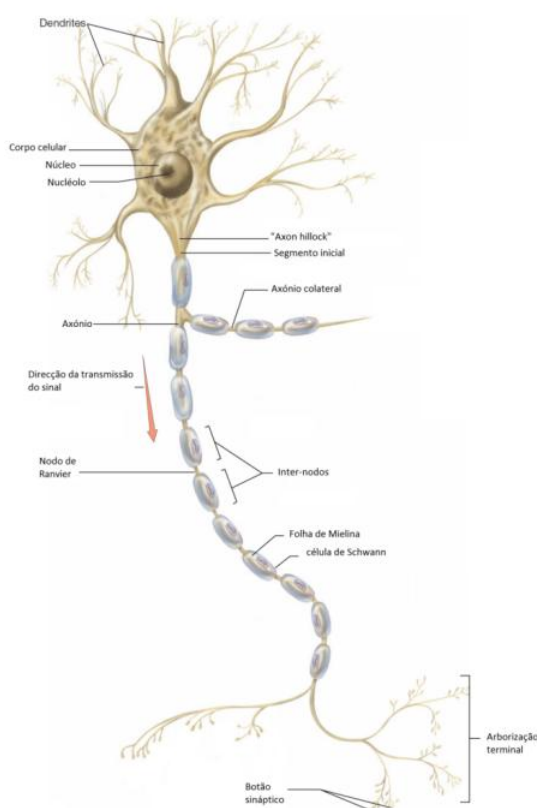


Figura 2.6 - Esquema geral de um neurónio multipolar. Retirado de *Kenneth S. Saladin*, 2003 [11].

2.4 Potencial de acção

A coordenação do comportamento de organismos multicelulares requer a troca constante de sinais entre células individuais. Os neurónios e certas células musculares são especializados em gerar e conduzir um sinal, um impulso eléctrico: o potencial de acção. A alteração do potencial eléctrico da membrana ocorre devido à abertura e fecho de canais de iões, transportadores e bombas de iões. Este potencial eléctrico é resultado da diferença de concentração de iões entre o interior e exterior da membrana da célula. A amplitude do potencial é praticamente constante e independente do estímulo. A sua condução é não-decremental, ou seja, a propagação de uma célula para outra ocorre sem perda de intensidade e é irreversível [11] [15] [16] [17].

Quando um neurónio está em repouso, o potencial eléctrico ao longo da membrana do axónio é, aproximadamente, -60 mV (o interior é negativo relativamente ao exterior). Os estímulos provocam a despolarização da membrana que chega a atingir o potencial máximo de 50mV (interior positivo relativamente ao exterior da membrana). A despolarização é seguida de uma rápida repolarização, retornando o potencial ao seu valor inicial de -60 mV [15] [16] [18].

Alterações no potencial da membrana são determinadas pela variação da concentração de iões. Estas concentrações correspondentes ao estado de equilíbrio (potencial de repouso) podem ser vistas na Figura 2.7.

De acordo com o gradiente de concentração, o K^+ tende a sair da célula; no entanto o potencial negativo no seu interior atrai o K^+ a permanecer ou entrar na célula. Estes dois factores contra-balançam no potencial de equilíbrio [13].

A despolarização da membrana provoca a abertura de canais Na^+ , que são sensíveis à tensão, iniciando assim variação do potencial de acção. A entrada de Na^+ despolariza ainda mais a membrana, e mais canais de Na^+ são abertos. Neste passo, os canais de Na^+ começam a ficar inactivos e os canais de K^+ começam a abrir permitindo a saída de cargas positivas, levando à repolarização da membrana. Perto do pico do potencial (~50 mV) os movimentos de Na^+ e K^+ compensam-se. Depois deste ponto, ocorre a repolarização com o domínio da saída de iões K^+ . Com esta corrente de K^+ para o exterior, ocorre hiperpolarização da membrana durante alguns ms, ocorrendo aqui a activação dos canais de Na^+ , voltando assim ao potencial de repouso [13] [15].

Apesar da membrana da célula ter atingido o potencial de repouso, os iões K^+ e Na^+ não se encontram na sua posição inicial. O transporte activo dos iões contra os gradientes de concentração é aplicado mediante uma bomba iónica, a bomba de sódio-potássio. Por cada três iões Na^+ transportados para o exterior, dois iões K^+ são transportados para o interior; este processo ocorre com a hidrólise de uma molécula de ATP para ADP. Esta bomba ocorre com alterações da conformação, exibindo alternativamente a ligação para com os três Na^+ ou para os dois K^+ . Esta mudança pode ocorrer devido à fosforilação e desfosforilação da proteína [13].

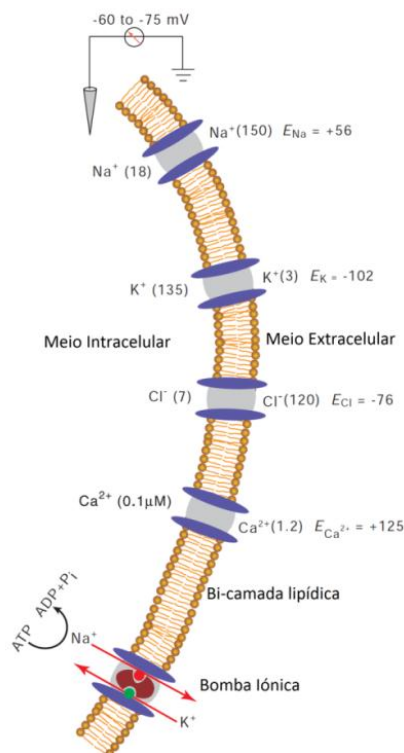


Figura 2.7 – Distribuição dos íões dentro e fora da membrana plasmática dos neurónios, mostrando os canais iónicos para Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , assim como a bomba Na^+/K^+ -ATPase. As concentrações dos íões são dadas em milimolar, com excepção da concentração intracelular do Ca^{2+} . O potencial de equilíbrio (E) é indicado em mV. Retirado de R.L. Squire et. al. 2008 [13].

Os potenciais de acção movem-se ao longo do axónio a velocidades até 100 m/s. A sua chegada ao terminal do axónio leva á abertura de canais de Ca^{2+} sensíveis à tensão, ocorrendo um influxo de íões Ca^{2+} , causando um aumento localizado da sua concentração.

Este aumento provoca a fusão de pequenas vesículas que contêm neurotransmissores (substâncias químicas) com a membrana plasmática da célula pré-sináptica (emissora), que assim os liberta para a fenda sináptica. Esta fenda é o espaço que separa a célula pré-sináptica da célula pós-sináptica (receptora), como ilustrado na Figura 2.8.

A ligação dos neurotransmissores aos receptores do terminal pós-sináptico desencadeia a abertura ou fecho de canais específicos de íões da membrana plasmática da célula pós-sináptica, levando a mudança no seu potencial de acção. Um único axónio no SNC pode ligar-se com vários outros neurónios induzindo respostas em todos eles simultaneamente, bem como um único neurónio pode receber estímulos de vários outros neurónios modulando assim a sua resposta [15] [16] [17] [18].

Quanto à velocidade com que o potencial de acção se transmite ao longo da fibra, este depende de dois factores: do diâmetro da fibra e da presença ou ausência de mielina. As fibras mais largas de secção conduzem o impulso mais rapidamente.

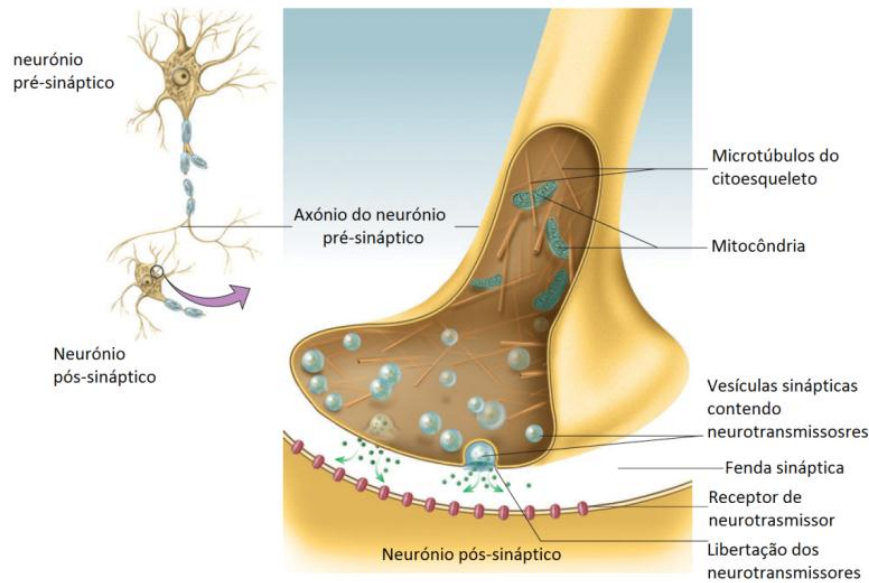


Figura 2.8 - Estrutura de uma sinapse química. Retirado de *Kenneth S. Saladin, 2003* [11].

Na superfície dos axônios que estão cobertos por mielina, a existência dos canais de iões é confinada aos nodos (ou nós) de Ranvier, que são espaços sem mielina. Assim, os iões Na^+ entram para o interior do axônio pelos canais existentes no nódulo de Ranvier e a sua difusão, sob o axolema (membrana plasmática que recobre o axônio), é bastante rápida. O axônio demonstra resistência para com esta propagação, de maneira que o sinal diminui ao longo do seu percurso. Contudo, com a existência de nodos de Ranvier separados por menos de 1 mm, o sinal proveniente de um nodo ainda é suficientemente forte para provocar a abertura de mais canais iônicos no próximo nodo. Cria-se assim um novo potencial com a mesma força que se propagará rapidamente até ao próximo nodo de Ranvier. Este modo de condução do sinal designa-se por condução saltatória.

2.5 Desenvolvimento de neurónios

A habilidade das células neuronais para polarizarem é essencial para a organização do sistema nervoso. Um dos primeiros e mais bem estudado sistema neuronal é o crescimento de células neuronais do hipocampo de embriões de roedores. Estes desenvolvem um único axônio e algumas curtas dendrites, mantendo as suas características estruturais a nível molecular. Durante a sua maturação, a sua morfologia muda drasticamente [19].

O processo de maturação pode ser dividido em 5 eventos sequenciais, como se ilustra na Figura 2.9 [20].

1ª etapa – ocorre a formação de pequenas protuberâncias correspondentes ao desenvolvimento da actina do citoesqueleto (lamelipodia);

2ª etapa – as protuberâncias desenvolvem-se e dão origem a pequenas neurites imaturas. Estas alternam com fases de alongamento e retracção, sendo aproximadamente iguais em comprimento. Nesta fase ainda não existem neurónios polarizados.

3ª etapa – Neste passo, uma das neurites cresce mais que as outras, obtendo características moleculares, estruturais e funcionais de um axónio. Diz-se que ocorreu a polarização do neurónio.

4ª etapa – Alguns dias após a formação do axónio, as restantes neurites alongam-se lentamente para formar dendrites.

5ª etapa – Normalmente o axónio e as dendrites continuam a amadurecer e a desenvolverem-se nos dias de cultura após o seu isolamento. Por fim, os neurónios cultivados formam ligações sinápticas, estabelecendo uma rede neuronal.

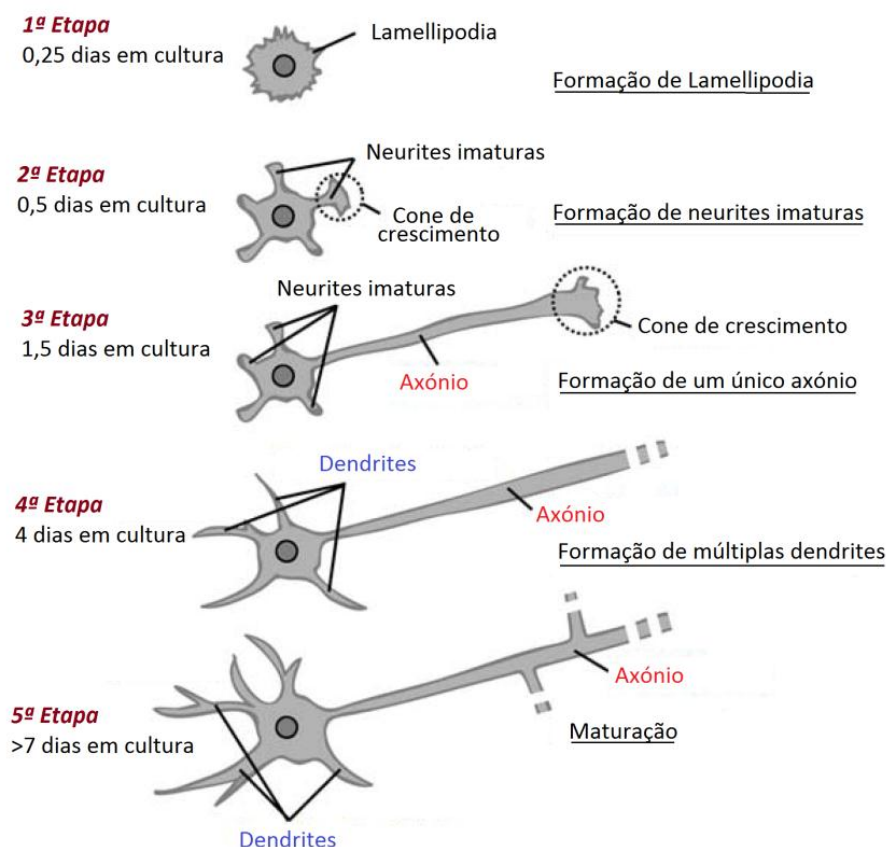


Figura 2.9 - Esquema ilustrativo do desenvolvimento de um neurónio embrionário ao longo do tempo, em cultura. Adaptado de *Yoshimura et.al., 2006* [20].

2.6 Citoesqueleto dos neurónios

O desenvolvimento de características morfológicas dos neurónios depende de uma complexa interação entre os diferentes elementos do citoesqueleto. Este é um agregado de estruturas formado por três classes de proteínas estruturais: microtúbulos (tubulina), microfilamentos (actina) e filamentos intermediários. Cada tipo de elemento do citoesqueleto tem funções únicas essenciais para o correcto funcionamento do sistema nervoso, interagindo entre si. A sua especialização é dinâmica, mudando constantemente, e é renovada a uma taxa determinada pelo metabolismo celular e ambiental [13] [21].

Microfilamentos

O citoesqueleto de actina existe em qualquer célula eucariota. A actina é um dos maiores componentes do citoesqueleto celular e uma das mais abundantes proteínas celulares. Embora nos neurónios os microfilamentos sejam bastante abundantes nos terminais pré-sinápticos e na arborização dendrítica, encontram-se também distribuídos por todo o citoplasma dos neurónios e glia.

Os microfilamentos têm uma função crucial na contractilidade das células, de elevada importância sobretudo aquando do desenvolvimento do axónio [20]. A sua regulação exacta é essencial em certos processos da célula tais como a migração, adesão e divisão celular. Este tipo de citoesqueleto tem igualmente um importante desempenho na formação de estruturas celulares tais como a lamelipodia, referida anteriormente [22].

A actina existe predominantemente em duas formas: actina monomérica ou G-actina e filamentos de actina ou F-actina que resulta da polimerização da G-actina. Esta última pode ser marcada mediante a utilização de anticorpos. A faloidina é um péptido bi-cíclico que pertence à família das toxinas, sendo comumente utilizada como ferramenta de imagem, marcando selectivamente a F-actina com alta selectividade. Usualmente, em microscopia, a faloidina é acoplada a um fluoróforo, o qual emite fluorescência e, desta forma, permite a identificação da F-actina.

Microtúbulos

Os microtúbulos são filamento cilíndricos polares, com 25nm de diâmetro e que podem chegar a ter algumas centenas de micrómetros de comprimento nos axónios. São constituídos por 13 faixas paralelas designadas por protofilamentos. Cada uma é um arranjo linear de subunidades globulares: α e β tubulina. Estas não são estruturas permanentes. Pelo contrário, a sua dinâmica permite a despolimerização e polimerização da tubulina mediante a necessidade e função da célula em determinados momentos. Este tipo de estruturas são igualmente responsáveis pela definição da morfologia da célula [11] [13].

A dinâmica dos microtúbulos regula os processos de maturação, incluindo a proliferação celular, migração e diferenciação, assim como o tráfego intracelular de proteínas e organelos. A sua estabilização previne a retracção axonal e aumento da dimensão do terminal do axónio após uma lesão no SNC. A presença de estabilizadores dos microtúbulos, como do Taxol, promove o crescimento do axónio a partir de neurites inespecíficas e a regeneração de fibras após uma lesão [23].

Diferentes proteínas interagem com os microtúbulos, de entre elas as MAPs – *microtubule associated proteins*. São importantes para a estabilidade dos microtubulos, participando desta forma na formação e organização do citoesqueleto. Proteínas como a MAP-2 e Tau são específicas dos neurónios, encontrando-se compartimentadas em regiões distintas, a MAP2 essencialmente nas dendrites e a Tau no axónio [13].

Filamentos intermediários

Os filamentos intermediários são fibrilas de 8 a 12 nm de diâmetro podendo atingir alguns micrómetros em comprimentos. As suas proteínas constituem uma família de 5 classes com expressões dependentes do tipo de célula e do estágio de desenvolvimento. Os filamentos intermediários neuronais têm um grau incomum de estabilidade metabólica, existem por entre os microfilamentos e assim têm a função de estabilizar a morfologia neuronal [13].

2.7 Transporte axonal

Para a manutenção de cada neurónio, o transporte intracelular torna-se num aspecto crucial na sua sobrevivência. Como tal, o transporte de proteínas e de organelos desde o corpo celular até ao terminal sináptico é realizado através do axónio, designando-se por transporte axonal. Este depende essencialmente da existência de proteínas motoras e de microtúbulos polarizados ao longo dos quais as proteínas de transporte carregam o material. A polimerização dos microtúbulos a partir dos monómeros de tubulina, ocorre nas chamadas terminações “positivas”, enquanto que as opostas onde poderá ocorrer a sua despolarização se designa de terminações “negativas”. O transporte anterógrado move o material em causa do corpo celular para locais mais afastados. Este é mediado por uma proteína motora, a cinesina, que se dirige para as extremidades positivas. No transporte retrógrado ocorre a movimentação do material das extremidades para o corpo celular, sendo este mediado por outra proteína motora, a dineína, que circula em direcção às extremidades negativas do microtúbulo [11] [13] [24].

2.8 Engenharia de tecidos e regeneração do tecido neuronal

O ciclo celular divide-se em duas fases principais: a interfase e a fase mitótica ou mitose. A interfase consiste no período entre o final de uma divisão celular e o início de outra. Processa-

se em 3 etapas: G1 (síntese proteica), S (duplicação do DNA) e G2 (duplicação dos centríolos). A mitose é o processo pelo qual as células se dividem em duas células filhas com cópias idênticas do DNA. O seu processo envolve 4 etapas fundamentais: prófase, metáfase, anáfase e telófase. Uma estrutura fundamental para este processo de divisão celular é o centríolo, que é composto por 9 tripletos de microtúbulos, num arranjo cilíndrico.

Os neurónios maduros não contêm centríolos pois ao atingirem o estado adulto, mantêm-se durante o resto da sua vida no estágio G0. O estágio G0 é uma fase do ciclo celular em que a célula permanece indefinidamente na interfase. Acontece entre a citocinese (divisão do citoplasma) anterior e a fase G1 (ver Figura 2.10).

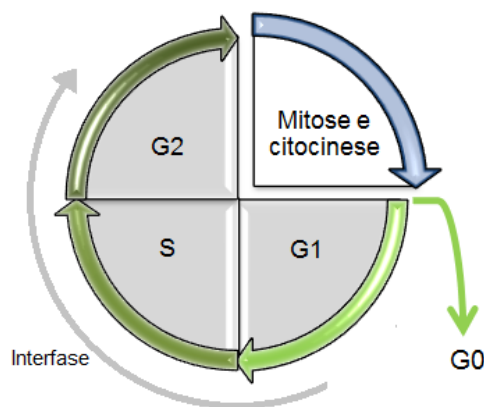


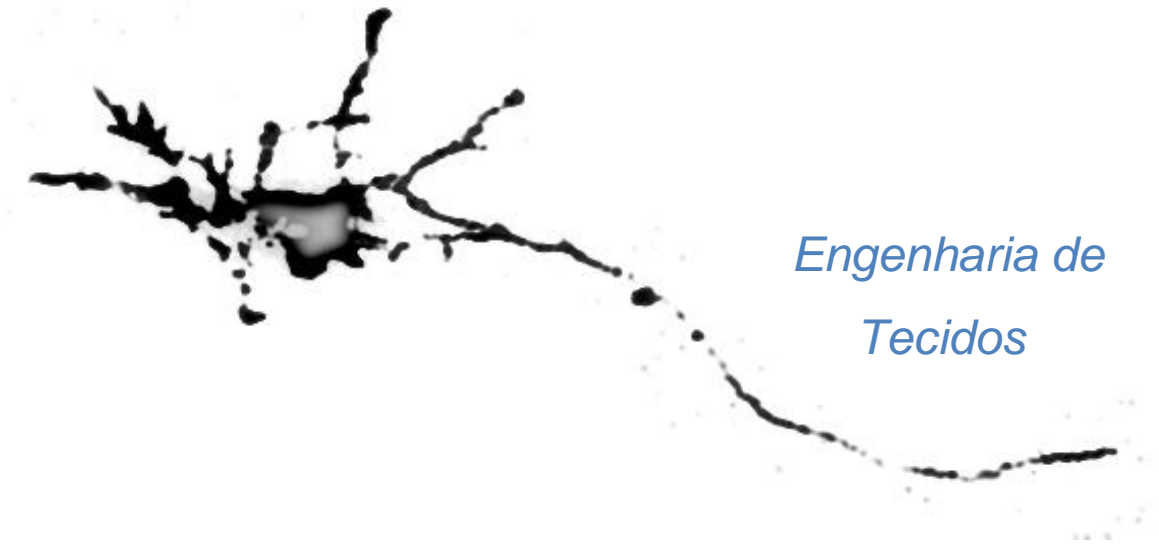
Figura 2.10 - Esquema do ciclo celular de uma célula. Os neurónios permanecem indefinidamente no estágio G0.

Assim, os neurónios maduros não sofrem o processo de divisão celular. No entanto, são células de longa duração, capazes de funcionar por centenas de anos.

Não havendo divisão celular dos neurónios, não ocorre formação de novo tecido ao longo do tempo e, como tal, após uma lesão axonal, não irá ocorrer regeneração espontânea nesse local.

Em engenharia de tecidos criam-se matrizes porosas com características semelhantes à matriz extracelular, com a finalidade de proporcionarem aos neurónios que permanecem viáveis após uma lesão, condições de crescimento (pontos de adesão e guias) por forma a que ocorra regeneração dos tecidos afectados.

Capítulo 3



*Engenharia de
Tecidos*

3. Engenharia de Tecidos

Nos últimos 50 anos têm sido feitos grandes avanços científicos e tecnológicos na área dos materiais aplicados à medicina e biotecnologia.

A inexistência de regulamentos nos tempos da Segunda Guerra Mundial até aos anos 60 levou a que alguns cirurgiões utilizassem metais e polímeros no fabrico de implantes e componentes médicos, aplicando-os clinicamente. Apesar do sucesso criado em torno destes novos dispositivos, ocorreram também falhas dramáticas. Como tal, os cirurgiões recorreram a cientistas e engenheiros, iniciando-se uma “colaboração” interdisciplinar.

Equipas interdisciplinares reconheciam então a necessidade de controlar a composição e pureza dos materiais que respondessem às necessidades clínicas. Isto estimulou o desenvolvimento de novos materiais tais como polímeros biodegradáveis.

Mais recentemente os cientistas e engenheiros têm combinado materiais com células vivas e factores de crescimento como ingredientes da chamada Engenharia de Tecidos. Esta foca-se na recuperação e regeneração dos tecidos e órgãos [25].

A engenharia de tecidos tem ganho elevada importância ao longo dos últimos tempos, devido à sua promissora capacidade de produção de tecidos que sirvam de suporte à regeneração de tecidos biológicos lesados devido a traumas, defeitos congénitos ou provocados por doenças. Poderão ainda assegurar alguma função do órgão lesado.

Materiais como polímeros ou cerâmicos podem ser usados com o propósito da regeneração de tecidos. Estes devem ser biocompatíveis e não tóxicos para o organismo. Podem ser tanto de origem natural como sintética [25] [26].

A engenharia de tecidos recorre principalmente a biomateriais degradáveis já que o seu objetivo é que um tecido artificial implantado dê lugar ao tecido biológico regenerado.

Os polímeros são a classe de materiais de eleição em engenharia de tecidos devido à sua versatilidade e a muitos deles satisfazerem os requisitos exigidos por esta área de desenvolvimento de substitutos temporários de partes do corpo. Muitos estudos têm sido efectuados tendo em vista a produção de matrizes poliméricas destinadas à regeneração de tecidos como diferentes características tais como o osso, a pele ou vasos sanguíneos.

3.1 Polímeros

Os polímeros representam a maior classe dentro dos biomateriais. Diferentes áreas de interesse biomédico incluem a utilização de polímeros, tais como implantes ortopédicos, dentários, de tecidos moles e cardiovasculares.

Podem ter origem natural, como a celulose, a borracha natural e o colagénio, ou sintética, como a borracha de silicone, poli(etileno tereftalato) (PET), poli-L-ácido láctico (PLLA), poli- ϵ -caprolactona (PCL) e o poli(óxido de etileno) (PEO), entre outros. Entre outras características, alguns destes polímeros são hidrofóbicos (como o PCL por exemplo), e outros são hidrofílicos (como o quitosano) [25] [27].

Os polímeros podem ser modulados de modo a alterar as suas propriedades mecânicas e químicas, bem como a sua forma. São também leves e inertes [26].

Polimerização é a reacção química que dá origem a uma cadeia polimérica a partir de unidades estruturais. O polímero é composto por uma longa cadeia que consiste na ligação de unidades estruturais, conhecidas como monómeros. Podem ser homopolímeros (polímeros que contenham apenas um tipo de monómero) ou copolímeros (dois ou mais tipo de unidades repetitivas diferentes).

Os polímeros sintéticos podem ser classificados em dois diferentes grupos, de acordo com o seu mecanismo de síntese ou polimerização: polímero de adição ou polímero de condensação.

No primeiro caso ocorre uma reacção em cadeia de ligação entre monómeros. Os monómeros insaturados reagem através dos estágios de iniciação, propagação e terminação de modo a produzir o produto final. Os iniciadores da reacção podem ser radicais livres, catiões, aniões ou catalisadores estereoespecíficos. Podem formar-se por este processo homopolímeros ou copolímeros.

A reacção de condensação consiste na combinação de duas estruturas moleculares, sendo descartada uma molécula mais pequena. Geralmente as unidades estruturais reagem para formar uma ligação covalente, com a eliminação de uma molécula de água, ácido clorídrico, metanol ou dióxido de carbono. Este tipo de reacção pode dar origem a copolímeros [25] [26].

A engenharia de tecidos recorre a polímeros que selecciona tendo em conta as propriedades que melhor se adequam para a aplicação específica.

A escolha dos materiais representa um ponto vital para assegurar o sucesso da regeneração do tecido. O design e a síntese de novos polímeros biodegradáveis pode providenciar respostas celulares controladas, o que é um aspecto fulcral Engenharia de Tecidos [1] [25].

A degradação de um polímero, ou seja, o processo químico que resulta na clivagem de ligações covalentes, pode resultar de processos de hidrólise, mecanismos enzimáticos e oxidativos [25].

Ao escolher um material polimérico biodegradável para suporte à regeneração de tecidos é importante ter em conta que os produtos de degradação sejam não tóxicos para o organismo do paciente [25].

3.1.1 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster alifático semi-cristalino, com um grau de cristalinidade que pode chegar aos 69% [28].

O PCL pode ser produzido por dois métodos diferentes: através da policondensação de um ácido hidrocarboxílico, e através da polimerização por abertura de anel (ver Figura 3.1) de uma lactona (éster cíclico – produto da condensação de um grupo funcional álcool e um grupo ácido carboxílico na mesma molécula). As suas propriedades físicas, térmicas e mecânicas dependem do seu peso molecular e do grau de cristalinidade [28].

À temperatura ambiente, é solúvel em vários solventes tais como clorofórmio, dimetilacetamida, acetona e ácido acético. É insolúvel em álcoois e em água. É um polímero que se degrada por hidrólise da ligação éster em alguns meses ou até anos, dependendo do seu peso molecular, do grau de cristalinidade e das condições de degradação. Existem diversos micróbios na natureza que são capazes de degradar completamente o PCL. A sua degradação é autocatalisada por ácidos carboxílicos libertados durante a hidrólise. No entanto o processo pode também ser catalisado por enzimas, resultando numa decomposição mais rápida [28].

A toxicidade do PCL tem sido extensivamente estudada. Baseado num largo número de testes, ϵ -caprolactona e poli(ϵ -caprolactona) (ver Figura 3.1) são actualmente considerados como não-tóxicos e biocompatíveis. É um polímero com aplicações em diversas áreas, como por exemplo no desenvolvimento de matrizes para engenharia de tecidos, sistemas de libertação de fármacos, adesivos e microelectrónica [25] [28].

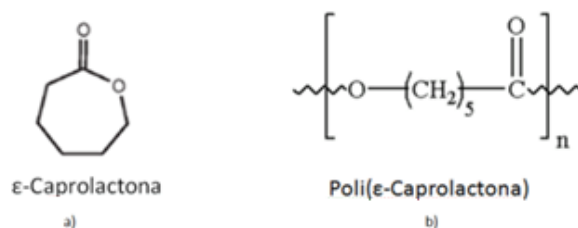


Figura 3.1 - a) Esquema da ϵ -caprolactona. Através de processos de polimerização, obtém-se b) estrutura molecular do PCL.

Para além de ser um polímero barato as suas propriedades mecânicas, nomeadamente a sua grande elasticidade, tornam-no apelativo para algumas aplicações.

3.1.2 Quitosano

A quitina é o segundo polissacarídeo natural mais abundante e é sintetizado através de inúmeros organismos vivos. Ocorre na natureza como microfibrilas cristalinas ordenadas e é a componente estrutural dos exoesqueletos dos artrópodes e paredes celulares de fungos e leveduras. As principais fontes de quitina são conchas de caranguejo e de camarão, considerados como lixo na indústria alimentar [29].

A quitina tem baixa toxicidade e é inerte no trato intestinal dos mamíferos. É biodegradável devido à presença de quitinases largamente distribuídas na natureza e encontradas em bactérias, fungos e sistemas digestivos de alguns animais. As quitinases estão envolvidas na defesa do organismo contra invasões bacterianas. Como a quitina não é facilmente solúvel, o seu derivado desacetilado – o quitosano (CS) – é frequentemente considerado para diversas aplicações [26] [30].

Estruturalmente, a quitina é um biopolímero com unidades de N-acetilglucosamina e de N-glucosamina (ver Figura 3.2) distribuídas em blocos ou aleatoriamente. Quando as unidades de N-acetilglucosamina são superiores a 50%, o polímero é denominado quitina. Porém, quando são as unidades de N-glucosamina (resultantes da desacetilação das unidades N-acetilglucosamina) superiores a 50%, o biopolímero é considerado quitosano. Este pode ser preparado com diversos pesos moleculares e graus de acetilação. O CS é solúvel em soluções diluídas de ácidos. A solubilização ocorre devido à fácil protonação do grupo NH_2 . Por este facto, o polissacarídeo é, geralmente, referido como um polieletrólito [26] [30].

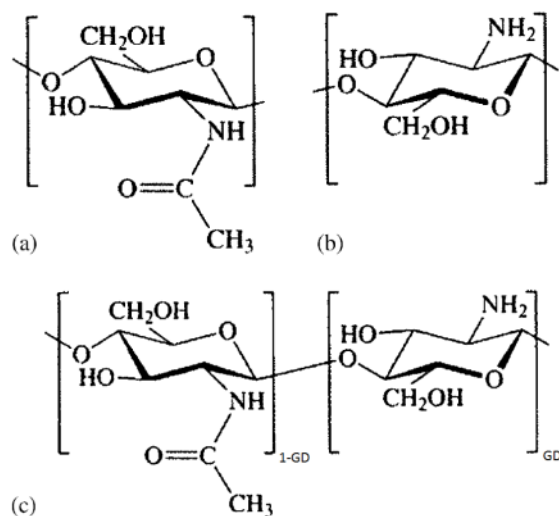


Figura 3.2 - Unidades repetitivas de a) N-acetilglucosamina; b) N-glucosamina; c) Estrutura da quitina parcialmente desacetilada, com grau de desacetilação GD. Retirada de *Rinaudo M. 2006*, [31].

As cadeias poliméricas do CS em solução podem ter conformação esférica, em espiral ou em haste, dependendo de dois parâmetros, os de estrutura (grau de acetilação e peso molecular) e os de solução (pH, força iónica, temperatura e solvente). O peso molecular pode induzir mudanças de forma. As conformações de baixo peso molecular do CS são mais extensas e rígidas do que as de maior peso molecular. Por sua vez, um aumento da força iónica faz com que a molécula contraia. A solubilidade do polímero depende da conformação. [30].

O CS é, no estado sólido, um polímero semicristalino que, por ser solúvel em água, é usado na produção de géis, filmes ou fibras, em aplicações para as quais a biocompatibilidade é essencial. A sua estabilidade é, geralmente, mais baixa do que a da quitina, devido ao seu carácter hidrofílico e à sua sensibilidade ao pH. [30].

Este polímero tem diversas aplicações na agricultura e nas áreas cosmética e biomédica. Por exemplo, é usado no encapsulamento e distribuição oral de fármacos (nomeadamente péptidos) e como adjuvante à cicatrização de feridas [31].

Exibe propriedades importantes para a aplicação em engenharia de tecidos, tais como a capacidade de adsorção de água e estímulo à actividade biológica devido à fácil interacção inespecífica entre o grupo amina e as células.

3.1.3 PEO – Poli(óxido de etileno)

PEO, PEG ou POE – o seu nome varia consoante a massa molar do polímero em questão: abaixo de 20.000 g/mol designa-se por PEG, acima de 20.000 g/mol refere-se ao PEO e a de-

signação de POE é para um polímero de qualquer massa molar. Na Figura 3.3 pode-se observar a sua estrutura química. Dependendo de n , varia a sua massa molar. É um polímero obtido por polimerização do óxido de etileno.

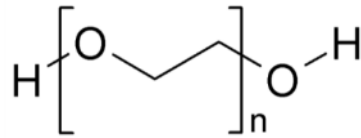


Figura 3.3 - Estrutura química do POE. Dependendo de n , a sua massa molar varia, podendo-se designar por PEO ou PEG (alta ou baixa massa molar, respectivamente).

O PEO é sintetizado por policondensação durante a qual é necessário manter a cadeia polimérica em suspensão. Esta reacção é catalisada por magnésio, alumínio ou compostos de cálcio.

A sua solubilidade em água e outros compostos polares é devida ao facto de ter uma estrutura molecular semelhante à da água, podendo participar em fortes ligações com o hidrogénio e o oxigénio em éteres e hidrogénio na água.

Segundo Duan et. al. [32], a adição de PEO a soluções de CS em ácido acético possibilitou a fiação na presença de um campo eléctrico (electrofiação) de fibras: a alteração de características tais como a condutividade na mistura facilitam a electrofiação da solução com os dois polímeros em comparação com a electrofiação de uma solução de apenas CS. Por ser um polímero fácil de electrofiar, a inclusão de PEO em soluções poliméricas é muitas vezes uma estratégia usada para produzir fibras por esta técnica muito apelativa em engenharia de tecidos.

Em termos biomédicos, é utilizado em diversos medicamentos farmacêuticos. A sua influência na comunicação entre as células neuronais após lesão, por injeção do polímero, foi investigada [33].

3.2 Electrofiação – Método de Produção das Matrizes

Apesar dos estudos da aplicação de um campo eléctrico a fluidos remontarem a 1745, a primeira patente que descreveu a operação desta técnica surgiu em 1934, quando Anton Formhals divulgou um aparelho para produção de filamentos poliméricos tirando vantagem das repulsões electrostáticas entre as cargas. O número de publicações neste campo tem vindo a aumentar exponencialmente nos últimos anos, graças à simplicidade notável, versatilidade e potencialidades do uso desta técnica [34] [35].

A electrofiação é um método versátil para a produção de fibras baseado em interacções electrostáticas entre elementos de um jacto viscoelástico, uma solução polimérica [34]. Pode ser

aplicado a uma vasta gama de polímeros naturais e sintéticos, misturas de polímeros ou de polímeros com outras substâncias como por exemplo nanopartículas metálicas ou cerâmicos [35].

Este processo permite criar fibras que vão desde alguns nanómetros até alguns micrómetros, com interior tanto sólido como oco, sendo excepcionalmente longas em comprimento. A razão entre a área da superfície exposta e o volume destas fibras é muito elevada. A deposição aleatória destas fibras numa superfície dá origem a matrizes com elevada porosidade e poros de tamanho reduzido [34] [36]. Estas possuem uma arquitectura similar à que ocorre naturalmente com as fibrilas de proteínas na matriz extracelular de alguns tecidos [3].

3.2.1 *Processo*

A Figura 3.4 mostra um esquema da configuração básica de uma montagem para levar a cabo o processo de electrofiação. Consiste em 3 componentes principais: uma fonte de alta tensão, uma agulha metálica e um colector (ligado à *terra*). A agulha está ligada a uma seringa que contém a solução polimérica. Com a utilização de um controlador de fluxo, a solução poderá fluir pela agulha a uma taxa constante e controlável. Uma pequena quantidade de solução na ponta da agulha adquire a forma de uma gota esférica devida à tensão superficial que tende a reduzir a superfície exposta do fluido. Quando uma alta tensão é aplicada à agulha (normalmente no intervalo de 1 kV a 30 kV), a gota que se encontra na sua ponta carrega e experimenta dois tipos de forças electrostáticas: a repulsão entre as cargas na sua superfície, e a força devida ao campo eléctrico estabelecido entre a agulha e o colector. Sob acção destas forças, a gota ir-se-á distender adquirindo a forma de um cone designado por Cone de Taylor. Uma vez ultrapassado um valor limite da tensão aplicada, as forças electrostáticas superam a tensão superficial da solução polimérica e, assim, forçam a ejeção de um jacto de solução em direcção ao colector [3] [34] [35] [36].

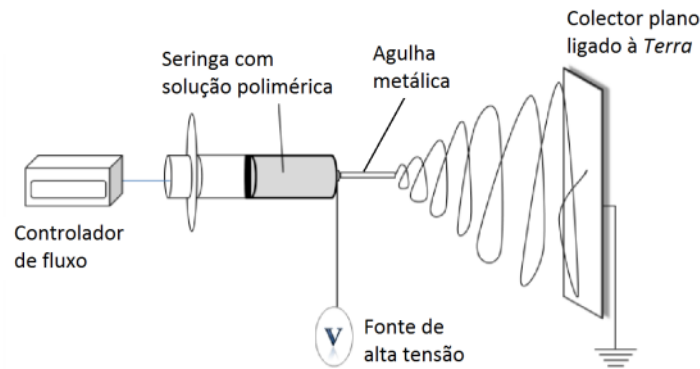


Figura 3.4 – Esquema geral do processo de electrofiação utilizando um colector plano. Adaptado de Yee-Shuan Lee et. al., 2011 [3].

Esse jacto electrificado apenas mantém a sua direcção durante alguns momentos após ser ejectado do cone de Taylor. Posteriormente, a sua aparência muda significativamente. Sofre processos de alongamento e “chicoteamento”, levando à formação de um longo e fino filamento, formando uma espiral que tem a forma de um cone, cuja base se encontra voltada para o colector. Uma vez que ocorre a evaporação do solvente enquanto o jacto é continuamente alongado, o seu diâmetro pode ser grandemente reduzido desde centenas de micrómetros para algumas dezenas de nanómetros. A fibra é depositada no colector com uma orientação aleatória, a velocidades que podem ser superiores a 40 ms^{-1} [34] [35].

Para obtenção de matrizes com fibras alinhadas, o processo deve ser diferente. Teo et.al. (2006) mostra diversas montagens de electrofiação com diversos colectores e também com possibilidade de utilização de múltiplas seringas [37]. Na Figura 3.5 pode-se observar um dos esquemas mais utilizados para obter este tipo de matrizes. Dependendo do aparelho, o colector rotatório pode atingir velocidades na ordem das 7000 rpm [38]. O aumento da velocidade de rotação do colector provoca um aumento da velocidade linear na superfície do cilindro. Este “puxa” a fibra, esticando-a, e enrola-a em redor do cilindro segundo a direcção de rotação, proporcionando matrizes com fibras alinhadas.

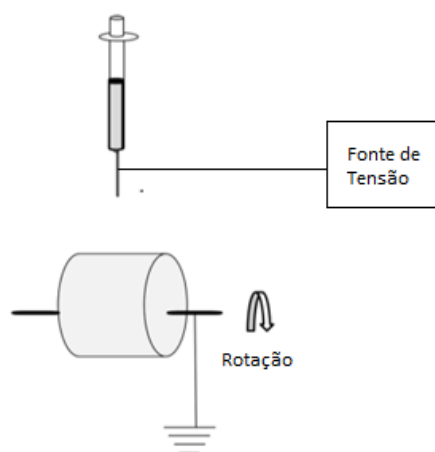


Figura 3.5 - Esquema geral do processo de electrofiação utilizando um cilindro como colector rotatório. A velocidade a que este colector roda depende do equipamento utilizado. Adaptado de Yee-Shuan Lee et al, 2011 [3].

3.2.2 Parâmetros de electrofiação

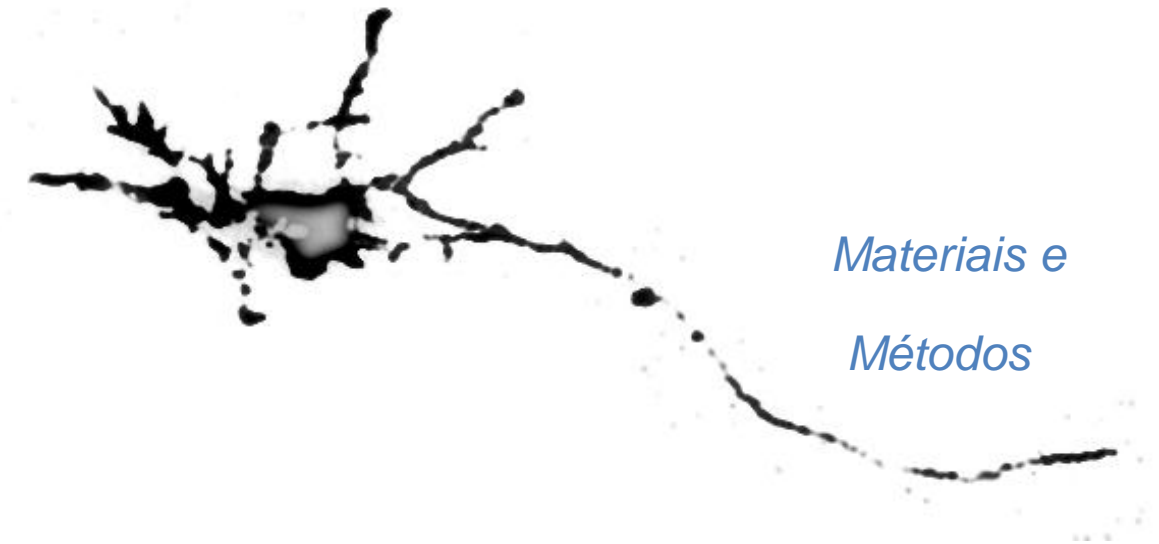
A possibilidade de electrofiar uma solução polimérica e a regularidade e os diâmetros das fibras obtidas dependem de diversos parâmetros, quer da solução (viscosidade, tensão de superfície, condutividade eléctrica e taxa de evaporação) quer do processo (a alta tensão aplicada à agulha metálica, o fluxo de solução, o diâmetro da agulha, a distância entre a agulha e o colector, a geometria do colector e o seu movimento, bem como a tensão aplicada ao mesmo), quer ainda ambientais (temperatura do ar e humidade relativa) [35].

A variação da tensão aplicada à agulha provoca alterações no campo eléctrico criado entre a agulha e o colector, e alterações na carga da solução polimérica. Um aumento da diferença de potencial aplicada à agulha provoca um aumento da intensidade do campo eléctrico, proporcionando uma aceleração maior da fibra ejetada em direcção ao colector. A tensão aplicada não pode ser demasiado elevada para que não ocorra a quebra das fibras (devidas a um fluxo insuficiente para a extracção imposta pelo campo) nem demasiado baixa, o que conduziria à projecção de pequenas gotas de solução para o colector (formadas devido à acção dominante da tensão superficial nestas condições). Quanto à carga do polímero, esta irá provocar uma repulsão entre os elementos do fio da solução que flui da agulha. Este aspecto é importante para a determinação do diâmetro das fibras – mais carga conduzirá a um maior estiramento do fio e a fibras mais finas. As forças viscoelásticas entre as moléculas do polímero na solução, determinadas pela viscosidade da mesma (a viscosidade depende da concentração do polímero e do seu peso molecular), devem ser fortes o suficiente para impedir a ruptura da fibra durante o seu estiramento mas não devem impedir o mesmo.

A quantidade de polímero que flui da agulha depende do fluxo imposto por um controlador. Entre valores de fluxo viáveis para o processo os mais baixos originam fibras relativamente mais finas do que os mais elevados. Valores demasiado baixos de fluxo conduzem a quebras na continuidade da fibra e valores demasiado elevados a acumulação de solução na ponta da agulha, podendo provocar projecções.

A variação da distância entre a agulha e o colector provoca variação do tempo que a fibra leva a chegar ao colector – tempo de voo. Se por um lado a diminuição da distância provoca uma diminuição do tempo de voo, também induz um aumento do campo eléctrico que, por sua vez, resulta numa diminuição do tempo de voo devida à maior aceleração na direcção do colector.

Capítulo 4



*Materiais e
 Métodos*

4. Materiais e Métodos

4.1 Electrofiação

As membranas foram obtidas utilizando a técnica de electrofiação, utilizando as montagens das Figura 4.1 e Figura 4.2. Nestas montagens utilizou-se controlador de fluxo Chemyx Fusion 100 Classic Syringe Pump, uma fonte de alta tensão *iseg t1cp 300 304 p*, uma seringa B|Braun Injekt® de diâmetro interno 12,74mm e uma agulha de calibre 22 com diâmetro interno 0,394mm. O colector plano e o colector cilíndrico foram construídos no Grupo de Engenharia de Tecidos da FCT-UNL.



Figura 4.1 – Fotografia da montagem de electrofiação com um colector plano.

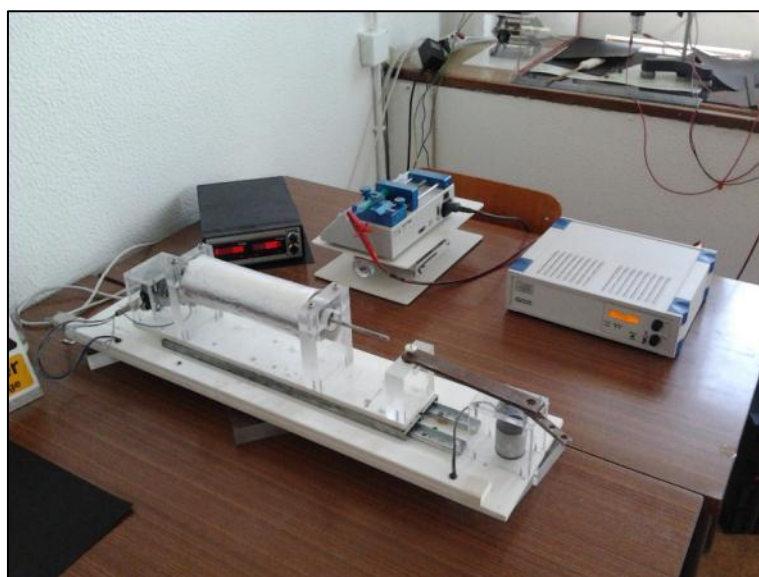


Figura 4.2 – Montagem de electrofiação com um colector cilíndrico rotatório.

O colector plano tem geometria quadrada, com dimensões 20x20 cm. Encontra-se ligado à terra e executa movimentos de rotação e de translação segundo um eixo horizontal, que lhe são conferidos por um sistema com dois motores, permitindo obter matrizes mais uniformes em espessura.

O colector cilíndrico rotatório tem 7 cm de diâmetro e 22 cm de comprimento, possuindo igualmente um sistema de translação segundo o seu eixo horizontal. Este tipo de geometria permite produzir fibras com diferentes graus de alinhamento, dependendo da velocidade de rotação do colector. Esta pode ir desde 250 rpm até 4000 rpm. Com o aumento da velocidade de rotação, aumenta a velocidade linear dos pontos na superfície do cilindro, pois $v = \omega \cdot r$, sendo ω a velocidade de rotação do colector, r o raio do cilindro e v a velocidade linear da sua superfície.

Para cada tipo de matriz produzida no colector cilíndrico, utilizaram-se diferentes velocidades de rotação, nomeadamente, 500 rpm, 1000 rpm, 2000 rpm, 3000 rpm e 4000 rpm, para avaliar o grau de alinhamento em função da velocidade.

Para o estudo das propriedades das matrizes, ambos os colectores foram forrados com papel de alumínio. Para posteriormente se realizarem culturas celulares em matrizes, estas últimas foram depositadas sobre lamelas circulares de 12 mm de diâmetro. Para a obtenção de matrizes desalinhasadas, as lamelas foram aderidas ao colector metálico, isolando-se o espaço em seu redor (ver Figura 4.3).



Figura 4.3 - Colector plano para colocação de lamelas.

Para o caso das matrizes alinhadas, utilizou-se uma fita condutora de cobre para colar as lamelas ao colector cilíndrico. Neste caso não foi necessário utilizar o movimento de translação. As lamelas foram colocadas no centro do cilindro em redor da sua superfície. Antes das deposições em lamelas, esta foram esterilizadas com etanol absoluto, até evaporação o excesso.

4.2 *Produção das matrizes poliméricas*

Cada matriz foi preparada a partir de soluções poliméricas. Usaram-se: PCL ($M = 70.000$ g/mol – 90.000 g/mol, Sigma-Aldrich), CS (Cognis S) e PEO ($M = 2.000.000$ g/mol, Sigma-Aldrich). Em testes preliminares usou-se ainda PEO de mais alta massa molar ($M = 8.000.000$ g/mol e $5.000.000$ g/mol). Como solvente foi utilizado o ácido acético glacial (PA Panreac) e água destilada.

As soluções foram produzidas adicionando-se inicialmente os polímeros, seguido do solvente, misturando os componentes e mantendo em agitação num agitador magnético até dissolução completa. Neste trabalho todas as concentrações estão indicadas em % peso por peso.

4.2.1 *Matrizes de PCL*

Para a produção das matrizes de PCL, optou-se por uma solução de 23% em 95% de ácido acético (AcAc) em água destilada (w/w).

Utilizou-se um colector plano ligado à terra para a produção das matrizes de fibras desalinhas. Com base nos resultados de um estudo prévio, fixou-se a distância da ponta da agulha ao colector em 15 cm, a tensão aplicada à agulha em 8 kV e o fluxo em 0,2 ml/h.

Com excepção da tensão aplicada, os restantes parâmetros foram os mesmos tanto para o colector plano como para o colector cilíndrico. Para este último, no qual se induziu o alinhamento das fibras, fixou-se a tensão aplicada nos 9 kV.

As soluções foram utilizadas num período de 2 dias após a sua produção para evitar a degradação do polímero por hidrólise ácida.

4.2.2 *Matrizes de CS*

As matrizes de CS foram produzidas a partir de soluções contendo uma pequena fracção de PEO ($M = 2.000.000$ g/mol) suficiente para permitir a sua fiação. Fixou-se a constituição da solução em 2,4%CS e 0,3%PEO em 90% de AcAc em água destilada (w/w).

Todas as matrizes foram produzidas no colector cilíndrico, ligado à terra. Utilizou-se uma velocidade de rotação de 250 rpm para obter fibras com uma orientação aleatória (desalinhas). Nas condições de produção das fibras a distância da ponta da agulha ao colector foi de 25 cm, a tensão aplicada à agulha foi 19 kV e o fluxo foi de 0,2 ml/h.

As soluções foram utilizadas num período de 1 dia após a sua produção para evitar a degradação do polímero por hidrólise ácida.

4.2.3 Matrizes de PCL e CS

Para as matrizes, de PCL e CS (PCL/CS) foi também utilizado PEO ($M = 2.000.000$ g/mol) o que permitiu fiar a mistura. A constituição da solução foi de 2,4%CS, 2,4%PCL e 0,3%PEO em 90% de AcAc em água destilada.

As condições de produção das fibras foram as mesmas das usadas na produção das fibras de CS (distância da agulha ao colector: 25 cm, tensão aplicada à agulha: 18 kV e fluxo: 0,2 ml/h).

As soluções foram utilizadas num período de 2 dias após a sua produção para evitar a degradação do polímero por hidrólise ácida.

4.3 Medição do ângulo de contacto

A medição do ângulo de contacto proporciona uma medida da hidrofiliicidade (ou hidrofobicidade) da matriz. Consiste numa gota de água colocada sobre a superfície do material a analisar, neste caso, sobre as matrizes. Ocorre um balanço entre a tensão superficial líquido-vapor do líquido, e a tensão entre a superfície sólida e a gota líquida. Esta medição pode então ser explicada como o balanço com que as moléculas do líquido são atraídas entre si, isto é, uma força coesiva, e a força atractiva por parte das moléculas da superfície em causa, ou seja, a força adesiva. Quando as forças adesivas com a superfície do sólido são muito grandes em comparação com as forças coesivas, o ângulo de contacto é menor que 90° , tratando-se de uma superfície hidrofílica. Pelo contrário, no caso de uma superfície hidrofóbica, o ângulo será maior que 90° (ver Figura 4.4) [25].



Figura 4.4 - Esquema ilustrativo da medição da hidrofiliicidade de uma superfície, através da medição do ângulo de contacto.

As medidas de ângulo de contacto foram efectuadas no aparelho KSV Contact Angle Meter – Cam 100 (ver Figura 4.5). Fizeram-se 10 medições para cada tipo de matriz ($n = 10$), com base

nas quais foi feito o cálculo do valor médio. Os resultados são apresentados como o valor médio \pm o desvio padrão experimental.



Figura 4.5 - Goniómetro KSV Contact Angle Meter - Cam 100, utilizado para as medições do ângulo de contacto.

4.4 Análise da Morfologia por imagens SEM

A morfologia das matrizes foi estudada utilizando imagens de formato .TIF obtidas por microscopia electrónica de varrimento (SEM, do inglês, *Scanning Electron Microscope*) usando o equipamento JEOL JSM-7001F (ver Figura 4.6). As matrizes, depositadas em papel de alumínio, foram fixadas num porta-amostras com fita condutora de grafite e recobertas a ouro. Foram depois analisadas recorrendo a um feixe de electrões acelerado por uma tensão de 15 kV.



Figura 4.6 - JEOL JSM-7001F Scanning Electron Microscope.

O diâmetro e alinhamento das fibras foram determinados recorrendo às potencialidades do *software* de análise de imagem *ImageJ*, *National Institutes of Health, USA*.

4.4.1 Diâmetro das fibras

Para a medição dos diâmetros das fibras recorreu-se à ferramenta “*find edges*” do programa *Image J*. Desta forma os bordos das fibras ficam destacados e é possível, com o mesmo programa, proceder à medição da distância entre eles. Os resultados dos diâmetros de uma amostra foram obtidos a partir de 40 medições ($n = 40$), com base nas quais se calculou o valor médio. Os resultados são apresentados como o valor médio +/- o desvio padrão experimental.

4.4.2 Orientação das fibras

O grau de alinhamento de fibras produzidas por electrofiação pode ser baseado na medição do ângulo de alinhamento de um número grande de fibras de uma amostra. Métodos estatísticos podem então ser usados para quantificar o grau de alinhamento. Esta informação pode ser apresentada sob a forma de um histograma das medições efectuadas, do valor médio e desvio padrão dos ângulos medidos (que pressupõe a assumpção de uma distribuição Gaussiana dos resultados) ou indicando os parâmetros de ajuste aos valores medidos de uma função de distribuição que os descreva adequadamente [39].

Neste trabalho, e para as fibras de cada composição obtidas no colector rotatório a uma velocidade de 4000 rpm (maior alinhamento), procedeu-se à medição do ângulo de alinhamento (valores entre 0 e 180°) de, pelo menos 70 fibras, representativas do conjunto, recorrendo novamente ao programa *ImageJ*. Os resultados são apresentados sob a forma de histograma e pela indicação do valor médio e respectivo desvio padrão.

Ayres et. al. demonstraram como a transformada rápida (ou discreta) de Fourier a 2 dimensões (FFT, do inglês *Fast Fourier Transform*) pode ser usada para analisar o alinhamento de fibras produzidas por electrofiação [38] [40]. Trata-se de uma alternativa ao método de medição de ângulos, mais rápida e que permite extrair informação acerca do grau de alinhamento preferencial.

Os métodos baseados na determinação da FFT são amplamente usados na análise e tratamento de imagens. A análise de Fourier fornece um modo de passar o mapa de intensidades de uma imagem (geralmente 256 níveis de cinzento) do domínio espacial (variáveis x e y) para o domínio de frequência.

Seja $f(x, y)$ com $x=0,1,2,\dots,M-1$ e $y=0,1,2,\dots,N-1$, uma imagem de dimensões $M \times N$, a FFT de $f(x, y)$ é $F(u, v)$ e é dada por:

$$F(u, v) = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} f(x, y) \cdot e^{-j2\pi\left(\frac{u \cdot x}{M} + \frac{v \cdot y}{N}\right)} \quad \text{Equação 4.1}$$

Este domínio da frequência irá mapear a taxa a que varia a intensidade dos pixels da imagem no domínio espacial. O espectro de Fourier, é uma imagem com níveis de intensidade proporcionais a $|F(u, v)|$ nas posições de uma representação polar ($F(u, v) = |F(u, v)| e^{j\phi(u, v)}$). Nesta representação polar, os pixels correspondentes às altas frequências ficam afastados e os das baixas frequências ao centro. A alta frequência corresponde a domínios espaciais que exibem mudanças abruptas na intensidade dos pixels da imagem original. As bordas, detalhes ou ruído desta imagem contribuem para o aparecimento de pixels de alta frequência.

Assim, $F(u, v)$ é composto por pixels na escala de cinzentos que são distribuídos num padrão que reflecte o grau de alinhamento presente na imagem de SEM (e também alguns artefactos devidos a bordos na imagem e ruído). A soma da intensidade dos pixels do espectro de Fourier ao longo de direcções radiais de uma circunferência centrada em $(u = 0, v = 0)$ representada em função do ângulo de aquisição é então usado para obter um gráfico de alinhamento. Nestes gráficos a direcção preferencial de alinhamento surge sob a forma de um pico pronunciado.

Neste trabalho foram calculados os espectros de Fourier das imagens de SEM usando, mais uma vez o programa *ImageJ*, das várias deposições e deles extraída informação acerca da existência de um ângulo preferencial de alinhamento. Os gráficos de alinhamento foram obtidos usando um *plug-in* desenvolvido no GREAT tendo por base o *oval profile plug-in* (de William O'Connell). Os valores dos gráficos de alinhamento foram normalizados por forma ao valor mínimo corresponder ao valor 0 (à divisão dos valores pelo valor mínimo retirou-se 1).

O ângulo da representação polar no espectro de Fourier tal como calculado pelo programa *ImageJ* tem uma correspondência com o ângulo de alinhamento medido com o mesmo programa. Essa relação foi tida em conta para estabelecer a comparação entre os ângulos de alinhamento evidenciados num histograma e determinados pela FFT para uma mesma matriz de nanofibras.

4.5 Densidade aparente e porosidade

Um aspecto da estrutura das matrizes que também foi analisado foi a influência do alinhamento na porosidade. Para tal consideraram-se as fibras de PCL desalinhas, obtidas no colector plano, e as fibras obtidas no colector rotatório a 4000 rpm.

A densidade aparente de uma amostra define-se como a relação entre a massa da amostra e o seu volume.

$$\rho_{aparente} = \frac{\text{Massa matriz}}{\text{Volume matriz}} \quad \text{Equação 4.2}$$

Com base na densidade aparente é possível calcular a porosidade da matriz. Esta é definida como a razão entre o volume dos poros e o volume total da matriz (que inclui o do material e o dos poros):

$$\text{Porosidade} = \frac{\text{Volume Poros}}{\text{Volume Matriz}} \quad \text{Equação 4.3}$$

Para uma matriz de PCL, vem:

$$\text{Porosidade} = \frac{\text{Volume Matriz} - \text{Volume PCL}}{\text{Volume Matriz}} = 1 - \frac{\rho_{\text{aparente}}}{\rho_{\text{PCL}}} \quad \text{Equação 4.4}$$

A densidade do PCL, ρ_{PCL} , é 1,145g.cm⁻³ [41].

Das matrizes com fibras desalinhadas e alinhadas de PCL, retirou-se uma amostra de cada, de dimensões (8,0 x 2,0) cm². A determinação da sua espessura foi efectuada com base em 20 medições em diferentes pontos da amostra, com a utilização de um micrómetro (*Mitutoyo Absolute Digimatic*).

A incerteza apresentada foi calculada com base na lei da propagação de incertezas.

4.6 Cultura primária de células do hipocampo

Lamelas com deposições de fibras das várias composições, desalinhadas e com o alinhamento resultante da deposição no colector cilíndrico a uma velocidade de rotação de 4000 rpm, foram preparadas como descrito anteriormente. Estas lamelas foram depois usadas nas culturas oferecendo a matriz como suporte à adesão e desenvolvimento de células embrionárias do hipocampo. Para cada composição e alinhamento consideraram-se duas condições: matrizes sem qualquer revestimento e matrizes revestidas com PDL/Lam.

4.6.1 Preparação das matrizes para a cultura

→ Esterilização

Procedeu-se à esterilização das amostras procedendo-se à sua imersão em etanol a 70% por 10 minutos e seguidamente irradiaram-se entre 30 a 60 minutos com a radiação UV emitida por uma lâmpada no interior de uma câmara de fluxo laminar.

O revestimento efectuado em algumas amostras foi conseguido colocando 50 µL de uma solução aquosa contendo 100 µg/ml de PDL e 4 µg/ml de laminina sobre cada amostra na véspera do dia em que teve início a cultura. Estas amostras permanecem à temperatura ambiente (TA)

durante a noite (*overnight*). No dia da cultura, foram lavadas duas vezes com água purificada (milliQ) para posteriormente se colocar o meio de sementeira (EMEM, 10mM Hepes, 1mM piruvato de sódio, 0,5mM glutamina, 12,5µM glutamato, 10% FCS, 0,6% glucose e 750 µL de gentamicina) sobre elas.

4.6.2 *Obtenção das células do hipocampo*

A fêmea *Murganho CD1* grávida de 16 dias foi sacrificada recorrendo a uma câmara com CO₂. Posteriormente o abdómen foi esterilizado com etanol a 70%. Com técnica apropriada, retiraram-se os fetos que foram, seguidamente, decapitados. As cabeças foram colocadas numa caixa de Petri esterilizada contendo CMF-HBSS (HBSS, 1%Hepes). Cuidadosamente removeram-se os cérebros, e posteriormente separou-se a região do hipocampo do restante córtex, segundo *Fernandes et al. 2009*. Transferiram-se os hipocampos para um tubo *ependorf* com 1,8 ml de CMF-HBSS e 200 µl de 0,25% tripsina, incubando por 15 minutos a 37°C. Removeu-se a tripsina e adicionou-se 1 ml de CMF-HBSS, deixando por 5 minutos à TA. Repetiu-se este último passo mais duas vezes. Com uma pipeta Pasteur procedeu-se à dissociação das células para posterior contagem com azul de Tripano. Semearam-se aproximadamente 5x10⁴ células em cada lamela de 12 mm, no meio de sementeira. Após 2-3 horas, o meio foi substituído pelo meio de crescimento neuronal (meio neurobasal, suplemento B27, 0,5mM glutamina e 750 µL de gentamicina).

4.7 *Observação morfológica das células*

4.7.1 *Análise citoquímica*

Com o objectivo de se visualizar o crescimento das células nas membranas ao longo do tempo, foram retiradas amostras para marcação aos 1 e 3 dias (divs). Este procedimento permite acompanhar o início do desenvolvimento dos neurónios e verificar o seu comportamento ao longo do tempo da cultura.

As células nas amostras retiradas da cultura foram fixadas paraformaldeído (4% paraformaldeído em tampão PHEM [60 mM PIPES (pH 7.0), 25 mM HEPES (pH 7.0), 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂] com 0,12 M sucrose) à TA, durante 15 minutos. Após lavagem com PBS, as células foram permeabilizadas com 0,2% Triton/PBS durante 10 minutos e depois lavadas 3 vezes com PBS. Este passo irá permitir a inclusão do anticorpo no interior da célula. Fez-se o bloqueio com 3% BSA/PBS por 30 minutos. Este passo bloqueia interacções não específicas de proteínas (neste caso, de anticorpo) com a membrana.

Para marcação do citoesqueleto foi utilizada a toxina faloidina dirigida para a actina, numa diluição de 1:50 em 1%BSA/PBS, durante 1 hora à TA. Para marcação dos núcleos das células, estas foram incubadas com *Hoechst* 33258 em PBS numa diluição de 1:1000 durante 2 minutos à TA. Depois de 3 lavagens com PBS, fez-se a montagem das lamelas em lâminas utilizando um meio de montagem contendo [2.5% 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane/150 mM Tris (pH 8.0)/30% glicerol] para reduzir a perda de fluorescência inerente à técnica. As imagens foram observadas sob um microscópio vertical equipado com um campo de epifluorescência (Zeiss, modelo Axio Scope A1), possuindo uma câmara digital integrada (Leica, modelo DFC490).

4.7.2 Avaliação do desenvolvimento axonal

→ Medição do comprimento

O comprimento dos axónios foi medido recorrendo, uma vez mais, ao programa *ImageJ*. Os dados são representados num gráfico com os respectivos desvios padrão.

→ Tratamento estatístico

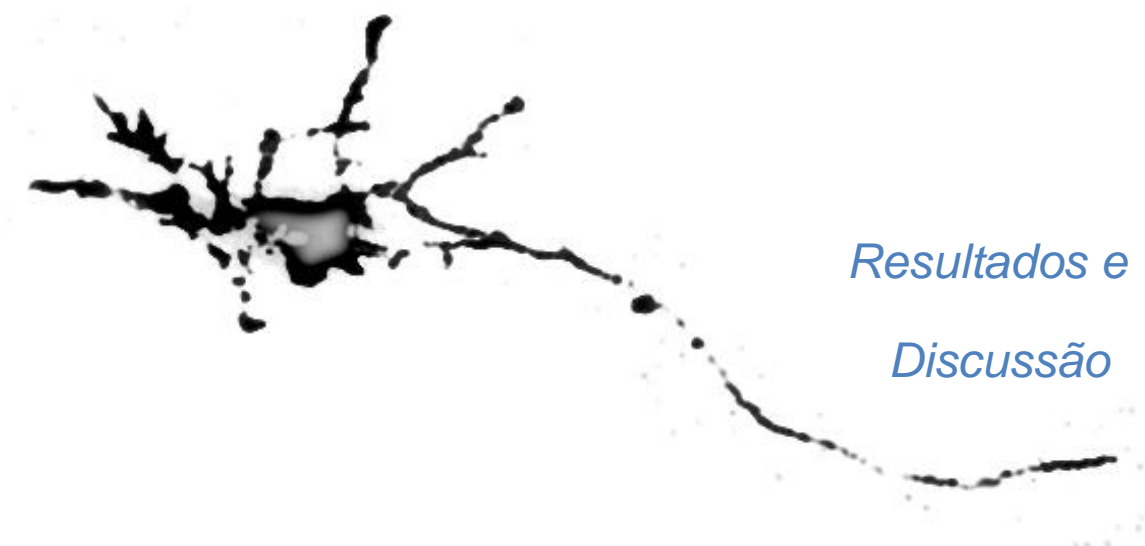
Foram usados os testes t de student e ANOVA para avaliar o significado estatístico das diferenças entre resultados. Estes testes devolvem o valor de p que indicam a probabilidade da diferença entre grandezas (valor médios com os respectivos desvios padrão) ser estatisticamente significativa. É aceite como diferenças estatisticamente significativas aquelas a que corresponde um $p < 0,05$, isto é, quando existe apenas 5% de probabilidade das grandezas serem iguais.

4.7.3 Microscopia electrónica

A morfologia das células foi também estudada através de imagens de SEM obtidas sob as mesmas características que as matrizes poliméricas (mesmo aparelho, mesma tensão de aceleração). Após a fixação das células ao 3º dia de cultura e lavagem com PBS, foi necessário proceder à sua desidratação com recurso ao etanol. Efectuou-se um tratamento com duas concentrações de etanol – 50% e 75% – por período de 10 minutos. Por último ficaram durante 30 minutos em etanol 100%, deixando-se evaporar o excesso. Este processo previne que o choque osmótico não seja forte o suficiente para que ocorra o rompimento da membrana citoplasmática.

As lamelas foram fixadas num porta amostras com fita condutora de grafite e recobertas a ouro.

Capítulo 5



*Resultados e
Discussão*

5. Resultados e Discussão

5.1 Parâmetros para a obtenção das matrizes

Para a produção de matrizes com boas características – fibra contínua, regular em diâmetro e que resultem em deposições espalhadas numa área considerável do colector (as deposições de soluções de polímeros de peso molecular elevado tendem a ser muito localizadas) – procedeu-se ao estudo dos parâmetros necessários à técnica de electrofiação. Os 3 principais parâmetros a estudar são: concentração do polímero, tensão aplicada, fluxo da solução e distância entre a ponta da agulha e o colector.

5.1.1 Matrizes de PCL

Para as matrizes de PCL, começou por se estudar a deposição num colector plano partindo de parâmetros iniciais que vêm de estudos efectuados anteriormente no grupo – concentração: 20%PCL em ácido acético glacial; tensão aplicada: 6,0 kV, distância agulha-colector: 15 cm e fluxo: 0,3 ml/h.

Com a tensão aplicada a 6 kV, as fibras apresentam diâmetro regular sem ocorrência de projecções. Contudo, o seu diâmetro era demasiado grande (aproximadamente 4 μm) em comparação com as fibras de CS (ver Figura 5.4). Para tensões superiores a 9 kV, o jacto torna-se descontínuo e origina fibras bastante irregulares (ver Figura 5.1).

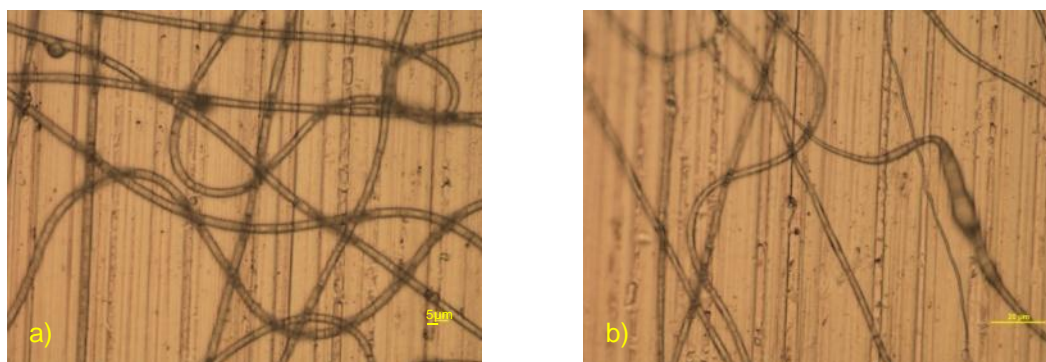


Figura 5.1 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 20%PCL em ácido acético glacial. Distância agulha-colector: 15cm; fluxo: 0,3ml/h. Tensão aplicada: a) 6kV; b) 12kV (barra de escala - 20 μm).

Sendo o fluxo utilizado já bastante baixo, uma das formas que se encontrou para tentar diminuir o diâmetro das fibras e também aproximar os solventes utilizados para as diferentes matrizes

foi incluir uma pequena percentagem de água. No entanto, esta não pode ser demasiado grande visto que o PCL é hidrofóbico (ver confirmação na Figura 5.11) e, conseqüentemente, insolúvel em água.

A viscosidade de soluções com a mesma concentração de PCL é superior quando se usa como solvente ácido acético glacial relativamente à resultante da dissolução no ácido com água. Assim, tendo em vista a obtenção de fibras regulares, estudou-se a fiação de soluções com concentrações de 23% e 25% de PCL em 90% AcAc.

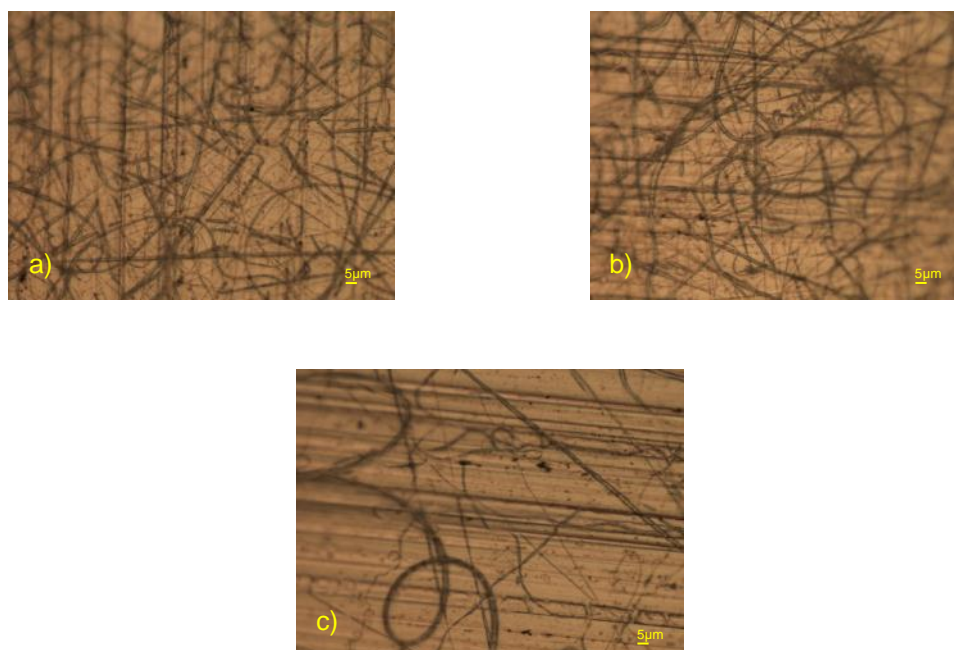


Figura 5.2 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 23%PCL em 90%AcAc. Distância da agulha ao colector: 15cm; fluxo: 0,1ml/h; Tensão aplicada: a) 8kV; b) 9kV; c) 10kV.

Na primeira (23%PCL), apenas foi possível iniciar a deposição aos 8 kV para um fluxo de 0,1 ml/h. Para valores mais baixos de tensão, o jacto não era ejectado. Diminui-se o fluxo porque ocorria formação de uma pequena gota na ponta da agulha. Esta continuava a formar-se mesmo com este baixo fluxo e com a tensão de 9 kV. Como se pode observar nas imagens da Figura 5.2, as fibras obtidas eram extremamente irregulares, contendo porções muito finas e outras com diâmetros bastante maiores. Experimentou-se aumentar o fluxo para 0,2 ml/h e 0,3ml/h para tensões superiores. No entanto, não se obteve melhores resultados quanto à morfologia das fibras.

Também a solução com 25%PCL em 90%AcAc deu origem a fibras irregulares, com existência de fusos e projecções. Assim, diminui-se a percentagem de água no solvente para 5% na solução de 23%PCL, iniciando o seu estudo com uma tensão de 6 kV e um fluxo de 0,1 ml/h, sempre com os 15 cm de distância.

Como se pode observar na Figura 5.3, para os valores de tensão mais elevados – 10kV e 12kV (imagens c) e d), respectivamente), as fibras começam a ser irregulares em diâmetro. Para 6kV e 8kV, as fibras apresentam-se boas, regulares e sem projecções, tendo melhorado significativamente a sua morfologia em comparação com as da solução de 23%PCL em 90%AcAc.

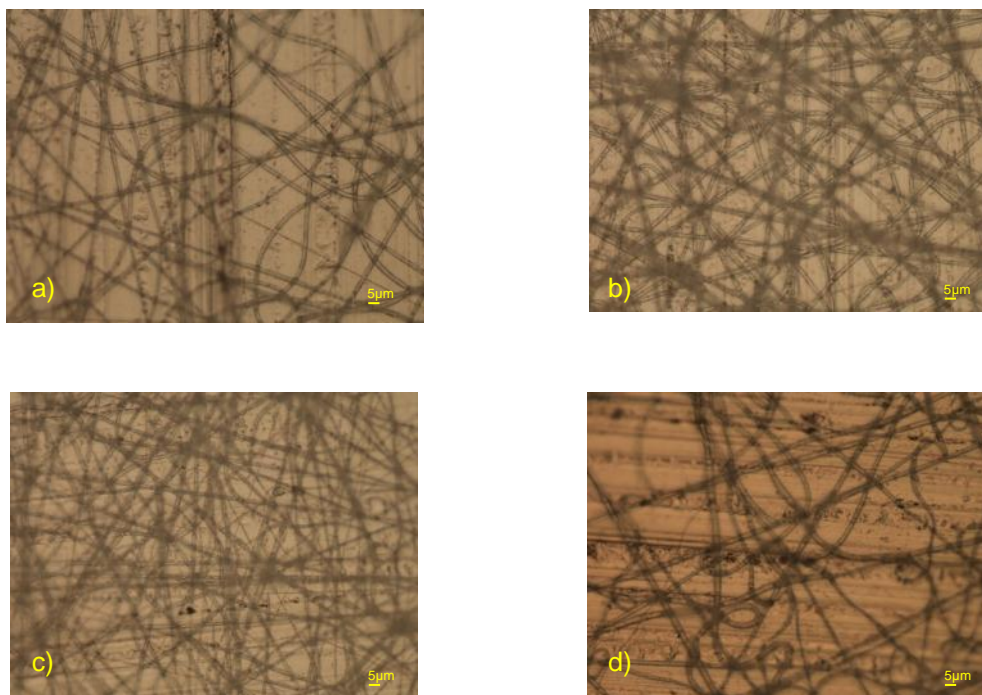


Figura 5.3 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras de 23%PCL em 95%AcAc. Distância da agulha ao colector: 15cm; fluxo: 0,1ml/h; Tensão aplicada: a) 6kV; b) 8kV; c) 10kV; d) 12kV. Barra de escala: 5µm.

Analisou-se também o efeito da variação do fluxo tendo-se fixado as condições de produção das matrizes de PCL no colector plano a partir da solução de 23%PCL em 95%AcAc em: 8 kV para a tensão aplicada, 15 cm de distância entre a ponta da agulha e o colector e 0,2 ml/h de fluxo.

Para a obtenção de fibras no colector cilíndrico, utilizou-se a mesma distância e o mesmo fluxo, usando-se, no entanto, tensões ligeiramente superiores, na ordem dos 9kV. Note-se que a configuração do campo eléctrico depende da geometria dos eléctrodos. O aumento do potencial possibilitou direccionar mais as fibras para o colector.

5.1.2 Matrizes de CS

Como já foi referido, a incorporação de uma pequena quantidade de PEO nas soluções de CS permite, de forma relativamente simples, a electrofiação das mesmas [32].

Tendo em conta o *know how* existente no grupo, iniciou-se o estudo da deposições com soluções com 2,0%CS e 0,25%PEO ($M=8.000\text{kg/mol}$) em 90%AcAc. No colector plano com os seguintes parâmetros – tensão aplicada: 16 kV; distância da agulha ao colector: 25 cm e fluxo: 0,2 ml/h.

Como se pode verificar na Figura 5.4, entre 18kV e 14kV obtêm-se boas fibras, com diâmetro regular e sem projecções de solução. No entanto, para valores a partir de 20kV, as fibras depositadas começam a apresentar diâmetros irregulares. Para valores inferiores a 14V ocorria acumulação de gota da solução na ponta da agulha e conseqüentemente projecções de solução na deposição (mancha circular na parte superior da Figura 5.4 e)).

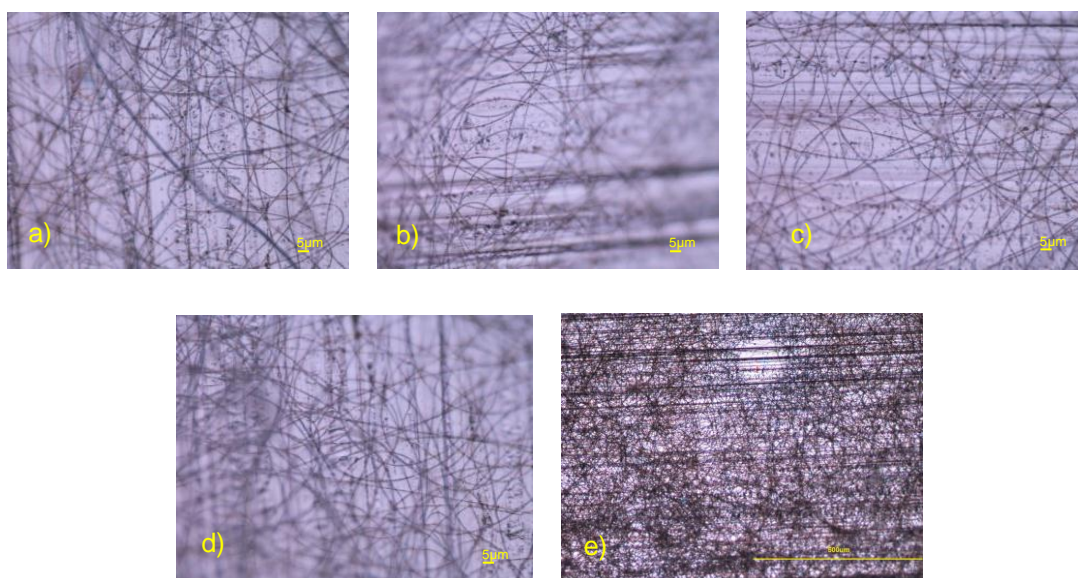


Figura 5.4 - Efeito da alta tensão na morfologia das fibras. Distância agulha-colector: 25cm; fluxo: 0,2ml/h. Tensão aplicada: a) 20kV; b) 18kV; c) 16kV; d) 14kV; e) 12kV.

Como se pode observar na Figura 5.5, o fluxo influencia o diâmetro das fibras: com um fluxo de 0,1ml/h obtêm-se fibras mais finas do que com o fluxo de 0,3 ml/h. No entanto, com 0,3 ml/h as deposições efectuadas a 16 kV e a 18 kV mostram projecções e fibras irregulares.

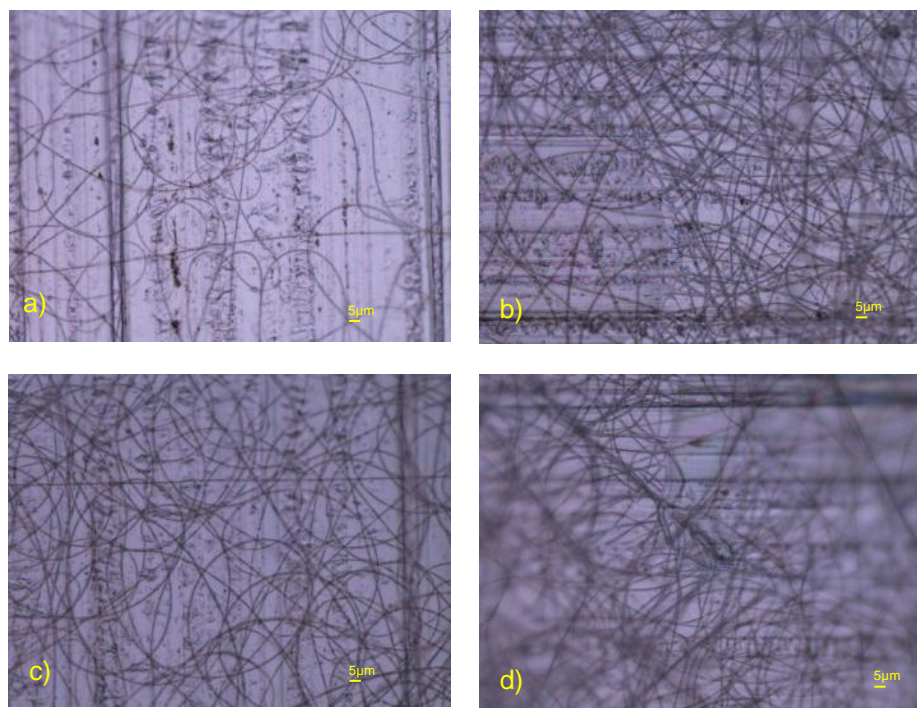


Figura 5.5 - Efeito do fluxo na morfologia das fibras. Distância agulha-colector: 25cm. a) 18kV, 0,1ml/h; b) 18kV, 0,3ml/h; c) 16kV, 0,1ml/h; d) 16kV, 0,3ml/h.

Fixaram-se assim as condições de produção das fibras de CS no colector plano a partir da solução de 2,0%CS e 0,25%PEO ($M=8.000\text{kg/mol}$) em 90%AcAc em 18kV, 25cm e 0,2ml/h. Estas deposições possuem fibras de diâmetro regular, sem projecções ou fibras fundidas.

Na tentativa de utilizar a menor quantidade possível de PEO, estudou-se a influência da massa molecular do PEO na qualidade das fibras. Utilizaram-se as massas molares de: 8.000kg/mol, 5.000kg/mol e 2.000kg/mol. Os resultados encontram-se condensados na Figura 5.6.

Na sequência de um jacto bastante direccionado para o colector, que praticamente não executa o típico movimento de chicoteamento durante a fiação, a solução de CS com PEO de 8000kg/mol mostra um padrão de deposição em espiral, como se pode observar na Figura 5.6. Para as massas molares menores, as deposições tornam-se menos direccionadas e este padrão tende a desaparecer. Decidiu-se assim usar o PEO de 2.000 kg/mol para produzir as matrizes.

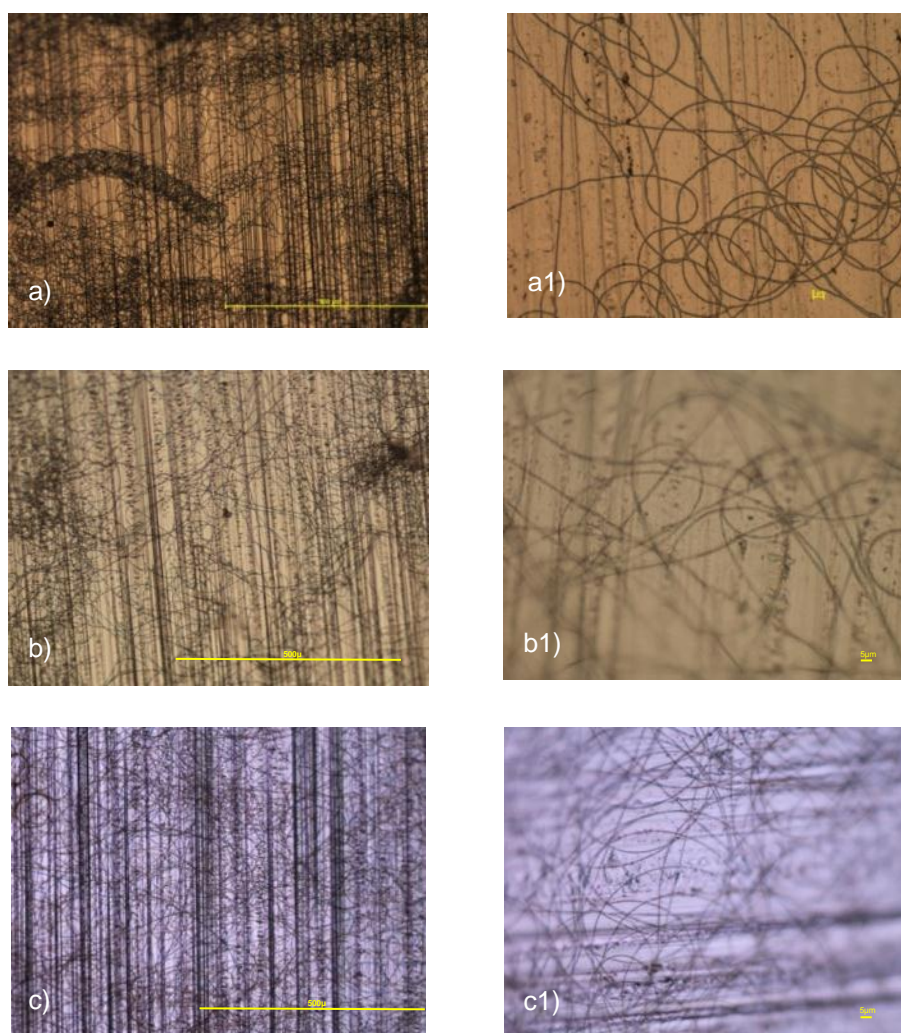


Figura 5.6 - Influência da massa molar do PEO das fibras produzidas por electrofição. A solução, em 90%AcAc contém 2,0%CS e 0,25%PEO de a) e a1) 8.000kg/mol; b) e b1) 5.000kg/mol; c) e c1) 2.000kg/mol. As imagens da esquerda correspondem a uma ampliação de 100x e as da direita a uma ampliação de 500x.

Como as deposições no colector plano apresentam superfícies de deposição pequenas, a carga transportada pelas fibras não escoia facilmente. Para as deposições mais longas a repulsão imposta às fibras pelas já depositadas faz com que a deposição adquira uma forma cônica saliente da superfície do colector. No colector cilíndrico, com movimento de rotação esta situação não acontece. Assim optou-se por efectuar todas as deposições no colector cilíndrico, produzindo até as fibras desalinhasadas neste colector num regime de baixas rotações.

Procedeu-se a um último ajuste da composição da solução que se fixou 2,4%CS e 0,3%PEO, o que permitiu diminuir o número de ocorrência de pequenas e pontuais projecções que ocorrem ao electrofiar esta solução. Os parâmetros usados na produção das matrizes no colector rotatório foram os anteriormente estabelecidos para o colector plano: 18 kV de tensão aplicada, 25 cm de distância entre a agulha e o colector e 0,2ml/h de fluxo.

5.1.3 Matrizes de PCL/CS

Para estas matrizes, utilizou-se o mesmo solvente e a mesma concentração de CS e PEO que para a solução de CS. A concentração de PCL estabeleceu-se igual à de CS. A adição de PCL nesta concentração praticamente não traz alterações à viscosidade da solução e esta pode ser fiada com os mesmos parâmetros do processo dos usados para a solução de CS.

Em resumo, a composição da solução usada fixou-se em 2,4%PCL, 2,4%CS e 0,3% de PEO. As matrizes foram produzidas no colector cilíndrico com os seguintes parâmetros de processo: um fluxo de 0,2 ml/h, 18 kV de tensão aplicada à agulha e 25 cm de distância entre a ponta da agulha e o colector.

5.2 Análise da morfologia por imagens SEM

Obtiveram-se imagens SEM dos 3 tipos de matrizes (3 composições: PCL, CS e PCL/CS), cada um com 6 graus de alinhamento diferentes. Estas imagens foram analisadas por forma a obter informação acerca do diâmetro das fibras e sobre os graus de alinhamento conseguidos em cada conjunto.

5.2.1 Avaliação do diâmetro das fibras

Os diâmetros das fibras de cada tipo foram medidos para as fibras de menor grau de alinhamento (desalinhadas) e maior grau de alinhamento, obtidas para uma velocidade de rotação do colector cilíndrico de 4000 rpm (alinhadas). Na Tabela 5.1 encontra-se a média dos diâmetros obtidos (D) e correspondente desvio padrão (σ). Na Figura 5.7 encontram-se as imagens e os histogramas das medições realizadas. Para a largura de cada barra do histograma foi usado metade do valor do correspondente desvio padrão.

Tabela 5.1 - Diâmetros médios das fibras desalinhadas e alinhadas para os 3 tipos de matrizes e condutividade das respectivas soluções.

Matriz	PCL		CS		PCL/CS	
	$D/\mu\text{m}$	$\sigma/\mu\text{m}$	$D/\mu\text{m}$	$\sigma/\mu\text{m}$	$D/\mu\text{m}$	$\sigma/\mu\text{m}$
Desalinhada	0,69	0,09	0,13	0,03	0,42	0,09
Alinhada	0,26	0,05	0,13	0,02	0,38	0,06
Condutividade	1,30 $\mu\text{S/cm}$		274 $\mu\text{S/cm}$		242 $\mu\text{S/cm}$	

Como se pode constatar, nas matrizes desalinhadas, as fibras de PCL são aquelas que têm um maior diâmetro ($D = 0,69 \mu\text{m}$). Estas foram as únicas que foram produzidas no colector plano e portanto sob um campo eléctrico de configuração diferente.

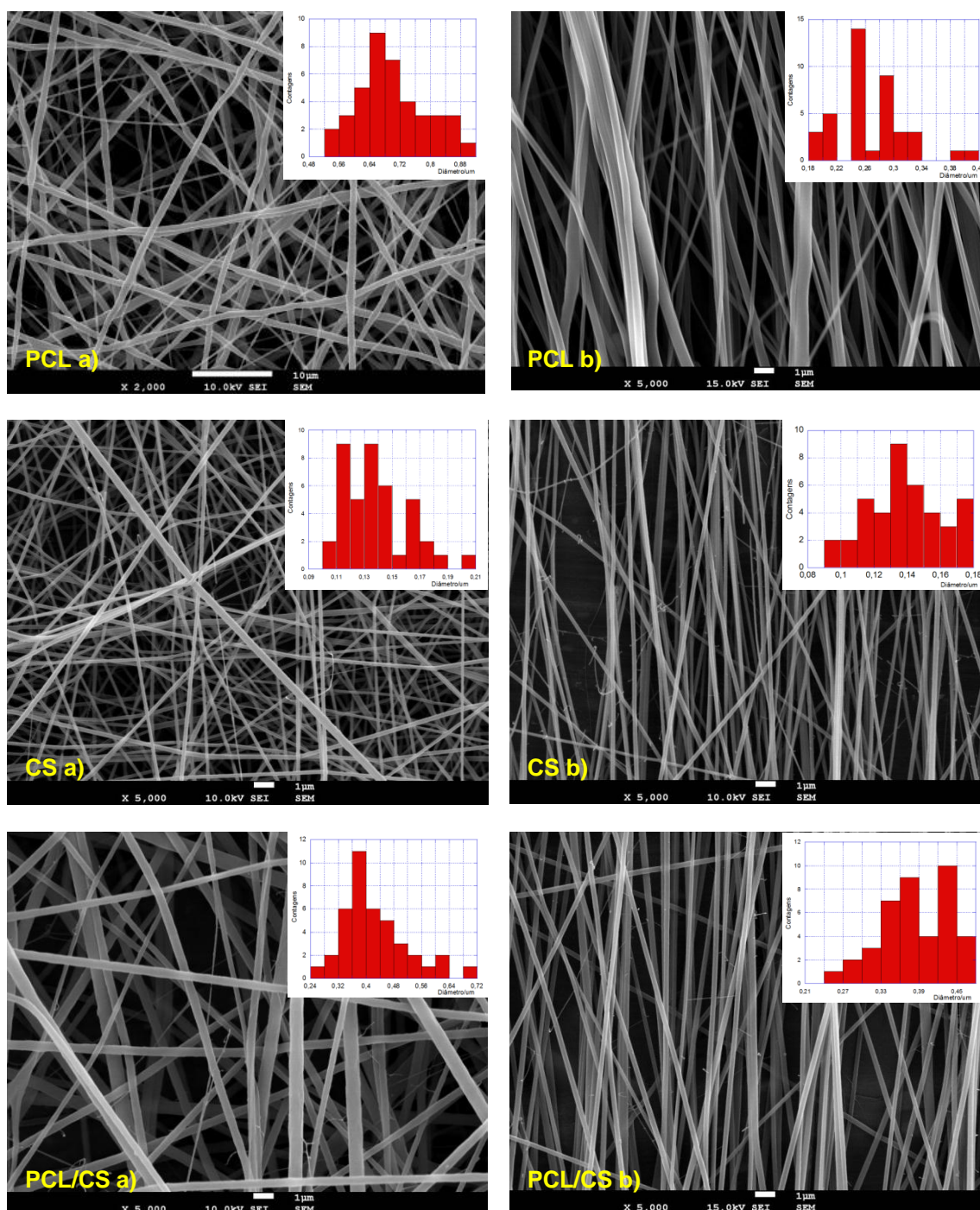


Figura 5.7 - Imagens de SEM das matrizes e respectivos histogramas relativos aos diâmetros das fibras: a) desalinhas; b) alinhadas. Todas as imagens têm uma ampliação de x 5000 excepto a PCL a) cuja ampliação é x 2000.

Entre as fibras desalinhas produzidas no colector cilíndrico a 250 rpm, as de CS ($D = 0,13 \mu\text{m}$) têm menores diâmetros do que as de PCL/CS ($D = 0,42 \mu\text{m}$), por transportarem maior carga (maior condutividade). As fibras de PCL da matriz desalinha apresentam alguma irregularidade no diâmetro ao longo do comprimento da fibra (ver Figura 5.7-a)) como já se tinha verificado que acontecia, aquando do estabelecimento dos parâmetros de fiação, quando o solvente possui água.

O diâmetro das fibras alinhadas de PCL diminui consideravelmente em relação ao das fibras desalinhadas. Para além da configuração do campo, a principal razão para este facto é a tensão mecânica (estiramento) que as fibras alinhadas sofrem pela rotação que faz aumentar o seu comprimento e diminuir a secção recta.

Quanto às fibras de CS, as alinhadas apresentam um valor médio de diâmetro muito próximo do das matrizes desalinhadas que já são bastante estreitas. A relativamente elevada condutividade das soluções de CS e, conseqüentemente, a carga relativamente elevada que transportam, está na origem de ambos os efeitos.

Já o efeito do aumento da velocidade de rotação do colector no diâmetro das fibras de PCL/CS tendeu a diminuir percentualmente um pouco o diâmetro. No entanto a diferença entre os diâmetros médios continua a ser pouco significativa estatisticamente. Esta diferença explica-se pelo pequeno decréscimo na condutividade da solução imposta pela presença do PCL.

5.2.2 Avaliação do alinhamento das fibras

Os ângulos de alinhamento medidos para as fibras alinhadas (colector rotatório a 4000 rpm) são mostrados no histograma da Figura 5.8. Na mesma figura são apresentadas as imagens de SEM, os espectros de Fourier (depois de efectuada a correcção da linha de referência para a medição dos ângulos) e o gráfico de alinhamento, obtido tal como explicado na secção de materiais e métodos. Este último gráfico está sobreposto ao histograma mostrando-se assim, num arranjo gráfico, o resultado das duas análises efectuadas.

Comparando os dois métodos de avaliação do alinhamento das fibras, podemos concluir que de ambos se conseguem extrair valores semelhantes para o ângulo preferencial de alinhamento – o valor médio dos ângulos representados nos histogramas (indicado do topo dos mesmos) é próximo do máximo de intensidade do gráfico de alinhamento (indicado no topo).

A 4000rpm, as fibras são depositadas e esticadas circunferencialmente na superfície do cilindro, sendo difícil, no entanto, um alinhamento perfeito de todas as fibras. Na análise feita às 3 matrizes, ocorre um pico bem definido para um determinado ângulo, sempre próximo dos 90°, como era pretendido.

Os espectros de Fourier, assim como os correspondentes gráficos de alinhamento foram também analisados para as matrizes com fibras desalinhadas. Os resultados da análise juntamente com a correspondente imagem de SEM encontram-se na Figura 5.9.

Como é possível observar pelos gráficos de alinhamento, relativos às matrizes desalinhadas, não se consegue identificar um ângulo de alinhamento preferencial.

De seguida foram obtidos os espectros de Fourier para as restantes matrizes obtidas para diferentes velocidades de rotação do colector. Estes, juntamente com as imagens de SEM, mostram-se na Figura 5.10.

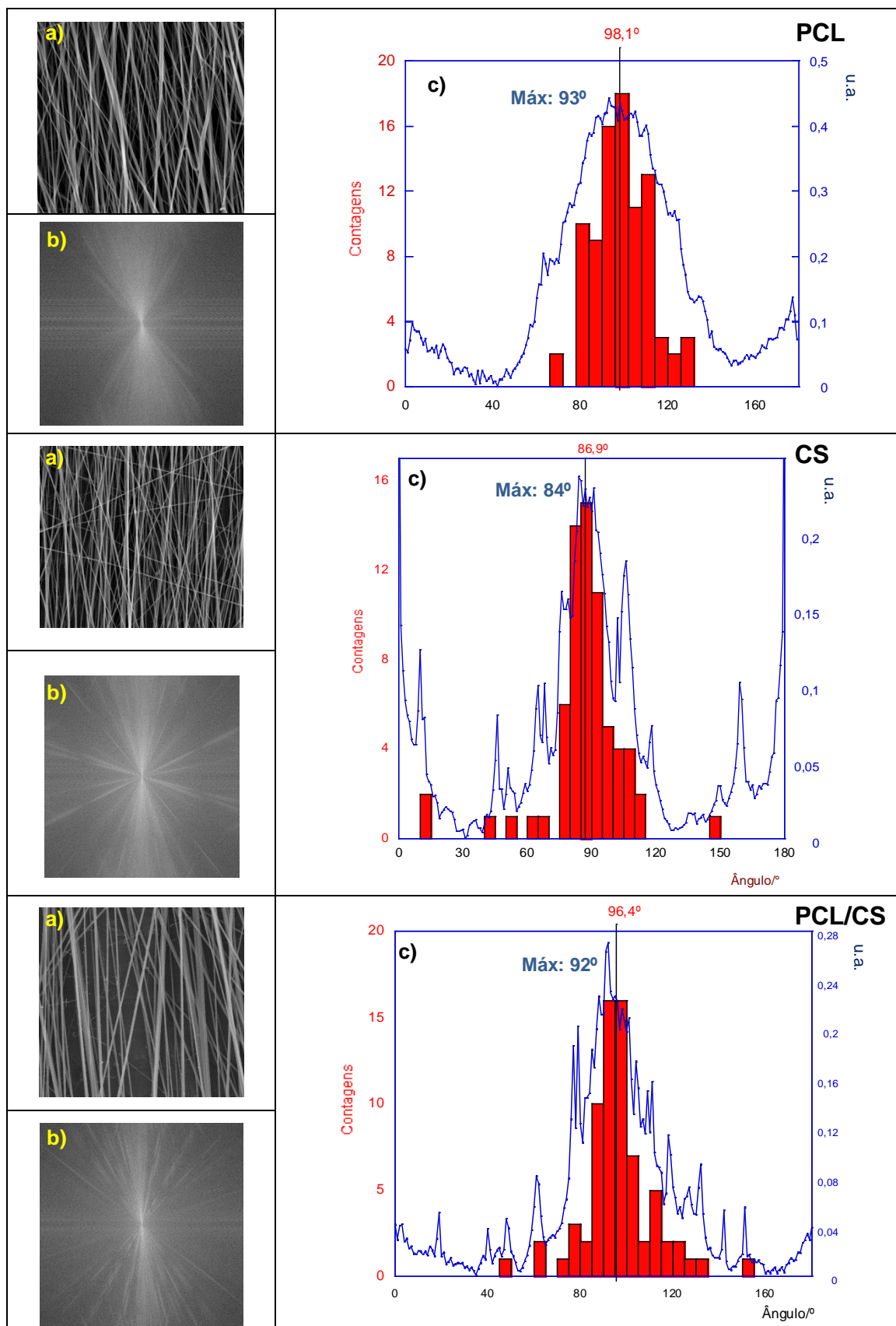


Figura 5.8 – Avaliação do grau de alinhamento das fibras alinhadas a partir a) da Imagem de SEM (x 2000); b) do espectro de Fourier e c) do histograma dos ângulos de alinhamento e gráfico de alinhamento (ver texto).

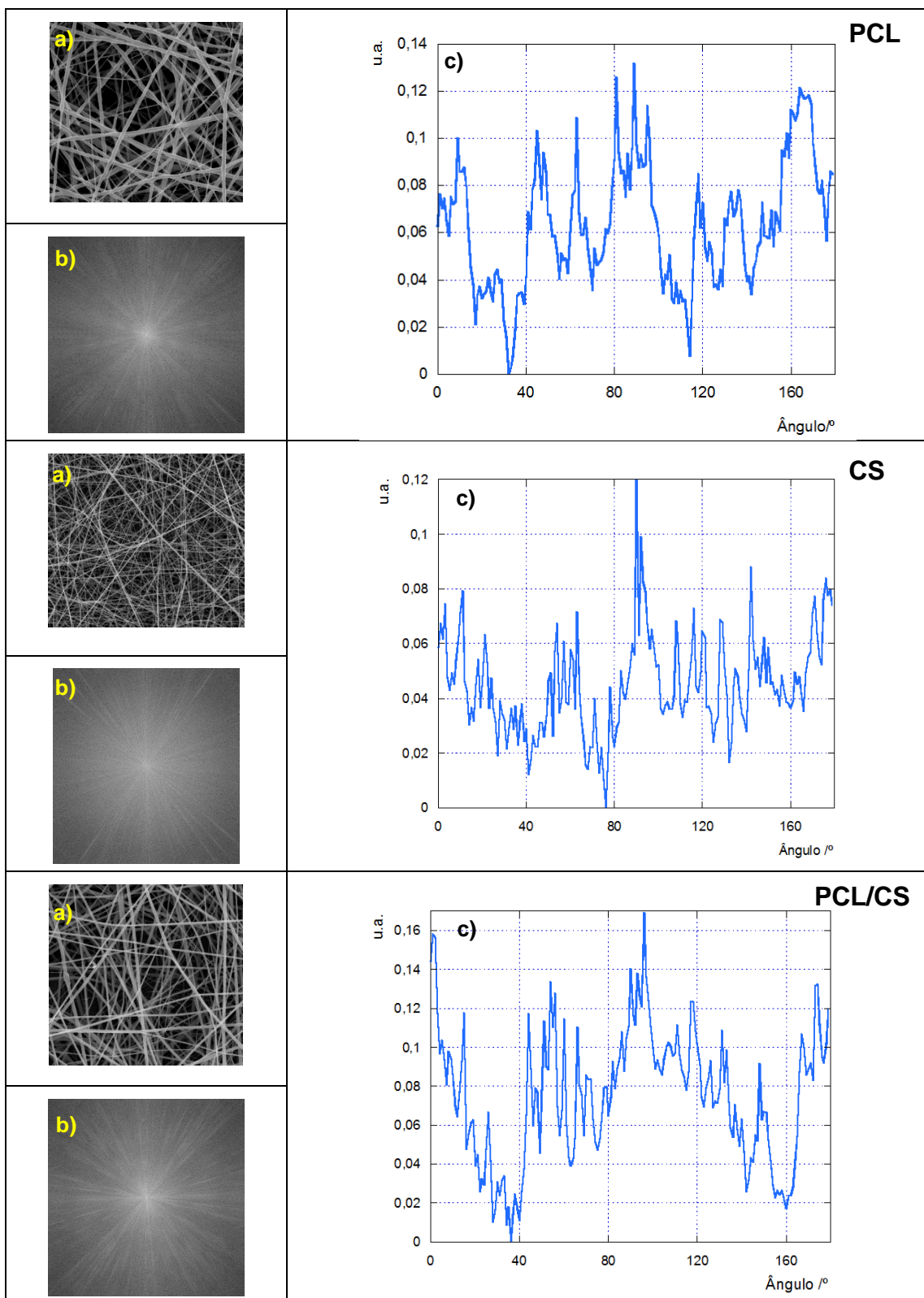


Figura 5.9 – Análise de Fourier das fibras desalinhas. **a)** Imagem de SEM (x 2000), **b)** espectro de Fourier de a) e **c)** gráfico de alinhamento.

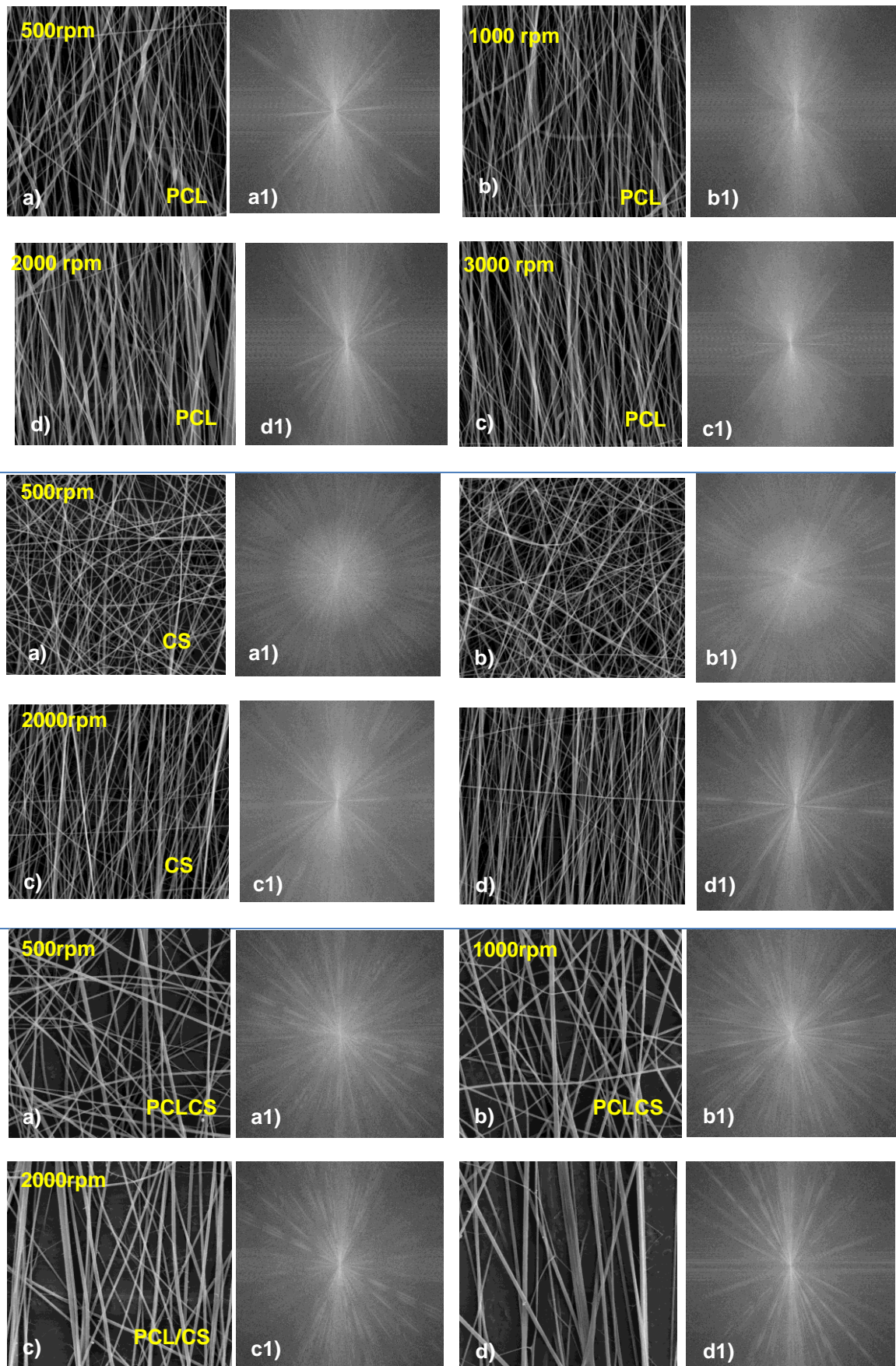


Figura 5.10 – Espectros de Fourier em função da velocidade de rotação.

É de notar que, para baixas rotações, consegue-se mais facilmente alinhar fibras de PCL do que as fibras de CS. Este comportamento é explicável pelo facto de as fibras de CS acumularem mais carga (maior condutividade da solução) e, como tal, o estiramento devido à repulsão electrostática é maior para este polímero do que para o PCL. Durante o voo o movimento de “chicoteamento” é, por isso, maior para o CS do que para o PCL, daí haver maior dificuldade em alinhar as fibras de CS.

5.3 Densidade e porosidade das matrizes

A densidade aparente e a porosidade foram calculadas para as matrizes desalinhada e alinhada de PCL.

Com base na medição do volume (espessura, largura e comprimento) de uma amostra de cada matriz e através da lei de propagação das incertezas, chegou-se aos seguintes resultados:

Tabela 5.2 - Valores obtidos para a densidade aparente e porosidade das matrizes de PCL.

	Matriz desalinhada PCL	Matriz alinhada PCL
Densidade aparente	$0,114 \pm 0,004 \text{ g.cm}^{-3}$	$0,187 \pm 0,011 \text{ g.cm}^{-3}$
Porosidade	90,0%	83,7%

A densidade aparente da matriz alinhada é superior, visto que o alinhamento das fibras proporciona um maior “empacotamento” das mesmas numa igual porção de volume. A porosidade é assim menor para as matrizes de fibras alinhadas.

Apesar do decréscimo da porosidade os valores medidos ainda são elevados provavelmente devido à existência de um número ainda significativo de fibras angularmente dispersas na matriz de fibras (essencialmente) alinhadas.

5.4 Ângulos de contacto

Os resultados das medições de ângulo de contacto estão condensados na Figura 5.11.

Na medição do ângulo de contacto das matrizes alinhadas, há que ter atenção à direcção do alinhamento das fibras, isto é, se o alinhamento é paralelo ou perpendicular ao plano da lente da câmara. Este factor é importante na medida em que a gota de água espalha-se ao longo das fibras, havendo uma notória variação do ângulo de contacto consoante o alinhamento relativo.

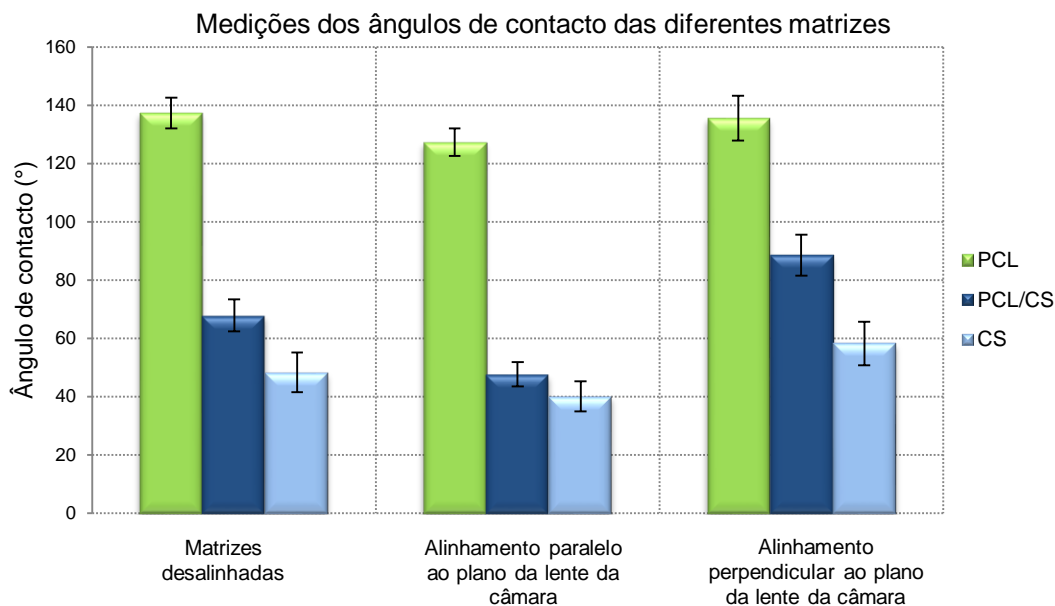


Figura 5.11 - Resumo dos ensaios dos ângulos de contacto medidos para as fibras desalinhadas e para as fibras alinhadas. Para as fibras alinhadas as medições foram efectuadas colocando a amostra por forma a que a direcção do alinhamento fique paralela ao plano da lente da câmara e por forma a que a direcção do alinhamento fique perpendicular ao plano da lente da câmara.

Tabela 5.3 - Valores médios dos ângulos de contacto para as matrizes poliméricas.

Valor Médio (°)	PCL	PCL/CS	CS
Matriz desalinhada	137±6	68±6	48±7
Matriz alinhada paralelamente	127±5	48±4	40±5
Matriz alinhada perpendicularmente	136±8	89±7	58±8

Como se pode observar, nas matrizes desalinhadas e alinhadas, a média dos ângulos de contacto referentes ao PCL são significativamente maiores do que os medidos para as matrizes de CS e PCL/CS, demonstrando um cariz extremamente hidrofóbico (ângulos superiores a 90°). Sendo uma matriz com carácter tão hidrofóbico, a pequena variação que houve dos ângulos da matriz alinhada e desalinhada é desprezável.

Uma vez que o CS é um polímero com grupos O e OH na sua constituição, é-lhe possível criar ligações químicas com a água. A medição do ângulo de contacto da matriz de CS revelou valores inferiores a 90° tanto para as matrizes com fibras desalinhadas como para as alinhadas. Na matriz alinhada, nota-se uma variação de mais de quase 20° caso a medição seja feita com as fibras paralelas (40°) ou perpendiculares (58°) à lente da câmara. Isto porque a gota de água

estende-se com alguma facilidade ao longo das fibras alinhadas, sendo um pouco absorvida, demonstrando ângulos mais pequenos com a superfície no caso das fibras paralelas à lente.

Quanto à matriz de PCL/CS, o valor médio dos seus ângulos de contacto situa-se entre os das outras duas matrizes, sempre inferiores aos da matriz de PCL e sempre superiores aos da matriz de CS, como seria de esperar. Contendo grupos OH do CS, irá ocorrer absorção de água que não ocorreu nas matrizes de PCL. Contudo, contendo também PCL, este dá um carácter mais hidrofóbico a esta matriz que às matrizes de apenas de CS.

5.5 *Análise do desenvolvimento da cultura primária de neurónios nas matrizes de PCL, CS e PCL/CS.*

As matrizes produzidas, para além da sua constituição polimérica apresentam diferentes características morfológicas. Como a capacidade dos neurónios aderirem às matrizes é fundamental para o estudo, decidiu-se ainda considerar o revestimento das fibras com compostos usualmente utilizados para permitir a correcta adesão destas células aos materiais de cultura (i.e. vidro e plástico), a poli-D-lisina (PDL) e a Laminina (Lam). Esta última molécula faz parte da matriz extracelular e facilita a extensão das neurites das células nervosas.

Na análise do desenvolvimento da cultura primária de neurónios nas diferentes matrizes, pretendeu-se pois correlacionar as características dos materiais com a adesão e crescimento das células neuronais embrionárias. Para tal, avaliou-se a influência:

1. da constituição das matrizes (polímeros).
2. do alinhamento das fibras em matrizes com a mesma constituição;
3. do revestimento das matrizes com PDL/Lam.

A adesão celular foi avaliada por observação e contagem do número de células por campo. No crescimento celular observou-se a orientação dos axónios e a sua extensão. A análise foi feita ao 3º div pois, como visto anteriormente (Figura 2.9), nesta altura será de esperar encontrar células com várias ramificações provenientes do corpo celular nomeadamente várias dendrites e um único axónio já bem definido.

5.5.1 *Análise da adesão celular às matrizes poliméricas*

Os resultados obtidos para a contagem do número de células estão apresentados na Figura 5.12.

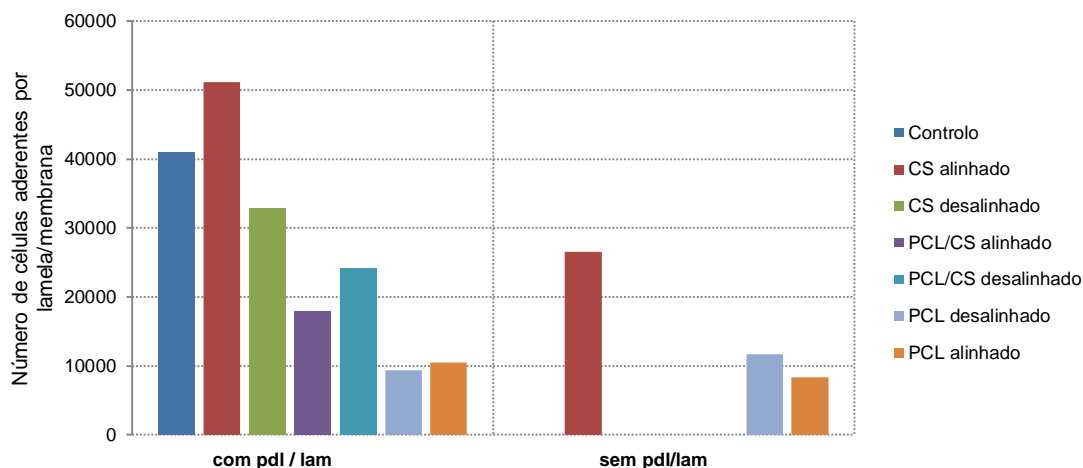


Figura 5.12 - Determinação do número de células cultivadas nas matrizes, ao 3º div.

Os resultados obtidos permitem extrair as seguintes conclusões principais:

- As matrizes de PCL foram as que demonstraram uma menor adesão celular à matriz. Nessas matrizes, nem o revestimento com PDL/Lam nem o alinhamento produzem alterações significativas na adesão celular. Uma razão para esta fraca adesão celular poderá ser o facto de estas matrizes serem hidrofóbicas (como revelaram as medições de ângulo de contacto). Este aspecto é importante visto que tanto o meio de cultura como o revestimento de PDL/Lam são meios aquosos.
- A matriz de CS com fibras alinhadas apresentou uma adesão celular muito superior à correspondente matriz de PCL, tanto com PDL/Lam como sem revestimento.
- A adesão na matriz de CS não revestida com PDL/Lam é inferior à verificada no controlo. Porém, a adesão é favorecida pelo revestimento das fibras com PDL/Lam - quando revestidas, as fibras de CS alinhadas foram as únicas que revelaram uma adesão celular superior à do controlo.
- Considerando as fibras de diferentes materiais revestidas com PDL/Lam, a seguir às de CS as que demonstraram uma melhor adesão celular foram as de PCL/CS e, por último, as de PCL.

Resta ainda salientar que a existência de aglomerados de células dificulta bastante a contagem do número de células por campo. Foram observados aglomerados sobretudo nas matrizes de CS, o que poderá sugerir que haja, neste caso, uma tendência para as células se agruparem antes de aderirem.

De modo a observar a interacção das células com as diferentes fibras obtiveram-se imagens de SEM, as quais se mostram na Figura 5.13.

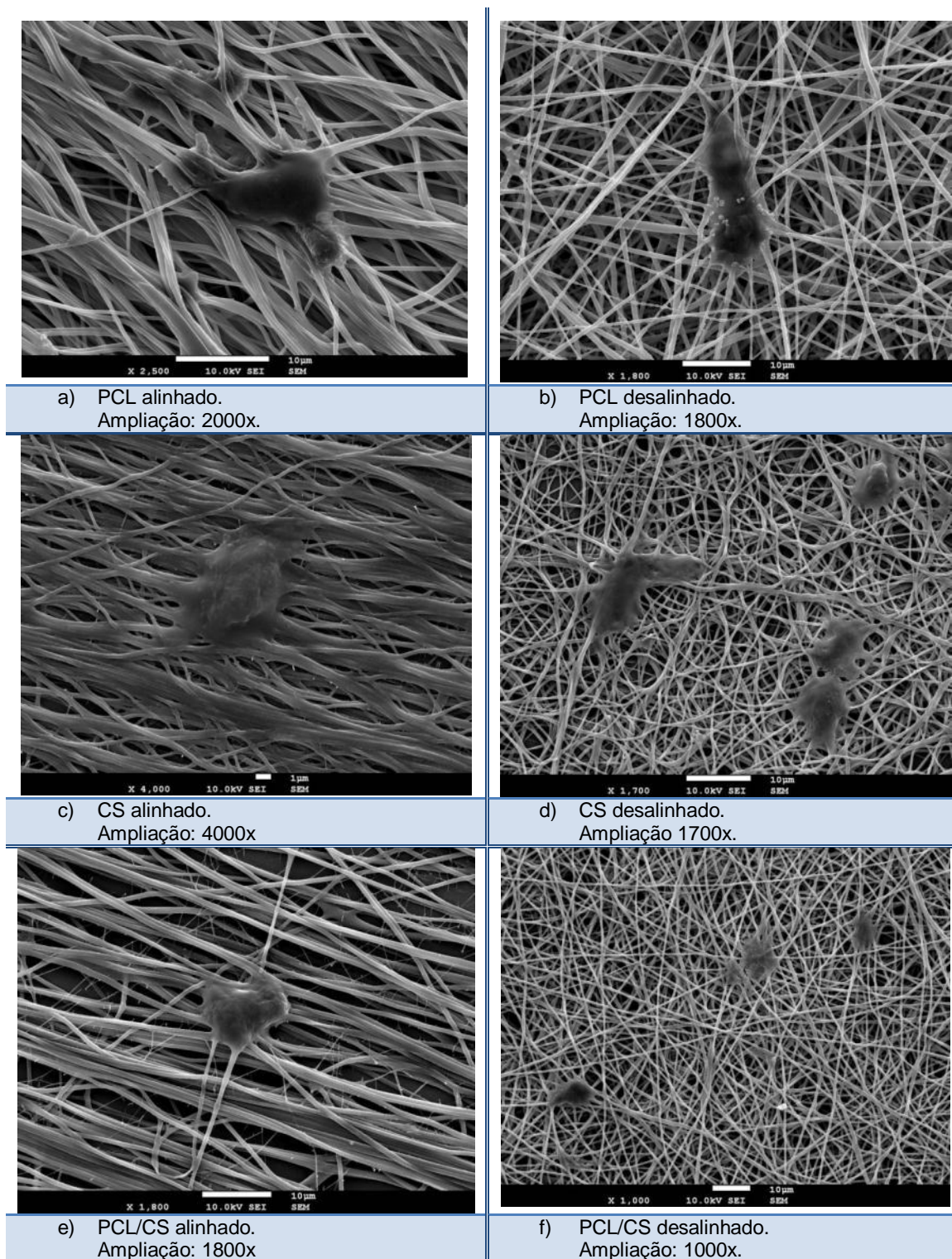


Figura 5.13 - Imagens de SEM obtidas para os 3 tipos de matrizes, com revestimento de PDL/Lam.

É visível, em todas as imagens da Figura 5.13, que as extremidades das células se encontram distendidas sobre as fibras em seu redor. Pode-se constatar que as células neuronais interagem com diversas fibras em simultâneo. O facto das células embrionárias crescerem (estádio 2 e 3) em fibras com diâmetros inferiores à média do diâmetro do axónio, promove a adesão quer

das dendrites quer do axónio que se desenvolve ao longo das fibras do substrato. É, no entanto, difícil identificar o axónio em toda a sua extensão.

A marcação dos neurónios com faloidina, que se liga e identifica aos filamentos de actina, permite observar por microscopia de fluorescência os neurofilamentos.

5.5.2 *Análise do desenvolvimento celular nas matrizes poliméricas*

Os neurónios em desenvolvimento nas matrizes foram observados recorrendo à marcação com faloidina que identifica os filamentos de actina (cor vermelha) (o que permite avaliar o crescimento dos axónios) e com *Hoechst* 33258 que marca os núcleos (cor azul).

Apresentam-se em seguida algumas imagens exemplificativas das células cultivadas nos diferentes tipos de matrizes.

É de notar que, devido às suas características, o crescimento das células nas matrizes ocorre por vezes com a extensão das neurites a diferentes profundidades na matriz. Este tipo de crescimento observou-se principalmente nas matrizes de PCL e PCL/CS. Nestes casos, torna-se complicado obter a imagem de uma célula completamente focada.

Na Figura 5.14 a) e b) observa-se a extensão do axónio ao longo da direcção de fibras de PCL alinhadas ao fim de 1 e 3 dias de cultura, respectivamente. Em ambas as imagens são visíveis axónios completamente desenvolvidos, observando-se com nitidez o cone de crescimento no final do axónio. Na imagem b) observa-se ainda que as dendrites parecem alinhar-se na direcção das fibras.

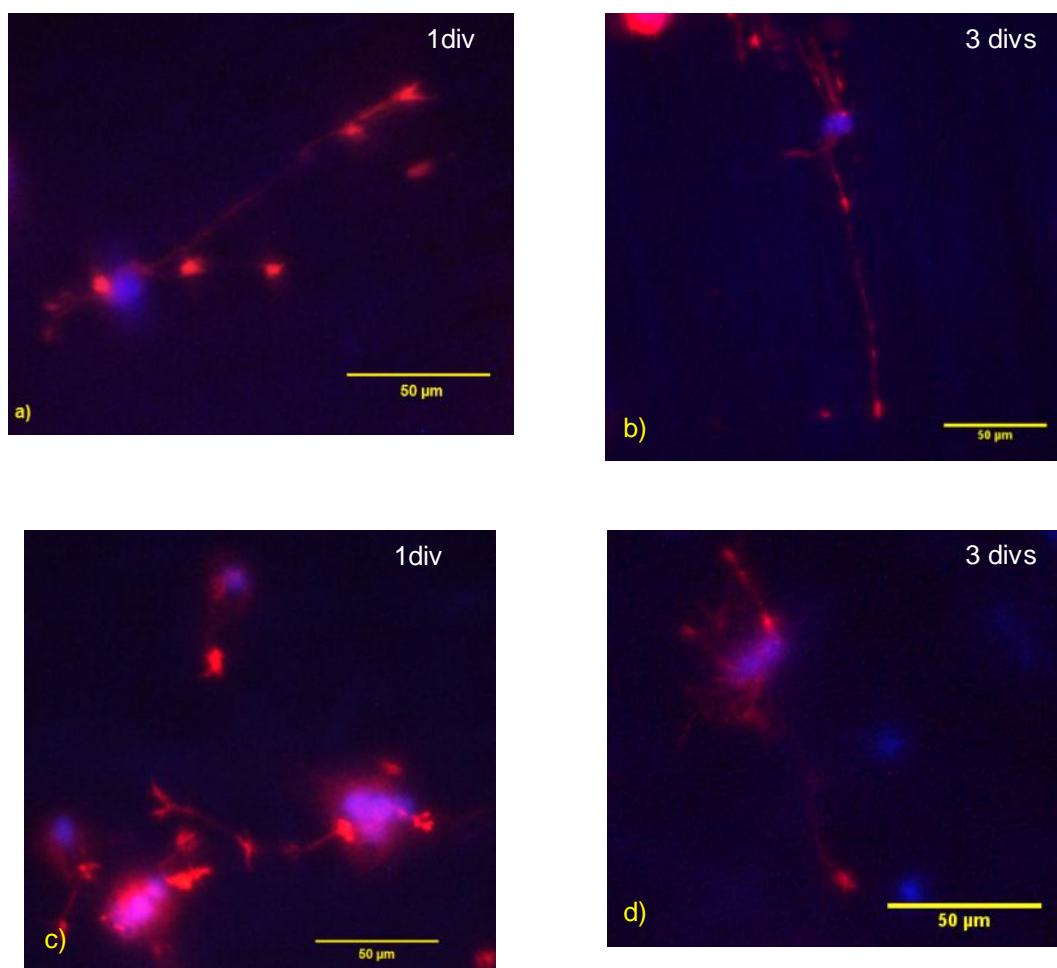


Figura 5.14 - Células neuronais cultivadas em matrizes de PCL. a) Célula com 1 dia de cultura em fibras alinhadas, sem PDL/Lam; b) Célula com 3 dias de cultura, em fibras alinhadas, com PDL/Lam; c) Células com 1 dia de cultura, cultivadas em fibras desalinhadas, sem PDL/Lam; d) Célula com 3 dias de cultura, cultivada em fibras desalinhadas, com PDL/Lam.

Na Figura 5.15, referente a matrizes de CS, com apenas 1 dia é perceptível que esta matriz providencia um bom substrato (Figura 5.15 a): observam-se várias células com axónios já desenvolvidos e de grande comprimento. A seta, na imagem a), indica o cone de crescimento na extremidade de um axónio. Também aqui se denota o desenvolvimento do axónio ao longo da direcção das fibras alinhadas (imagens a) e b)). Na Figura 5.15 c), ao primeiro dia de cultura numa matriz de CS com fibras desalinhadas é visível um axónio desenvolvido, assim como as dendrites bem definidas. Encontram-se também outras células da neuroglia em estádios embrionários. Estas células estão pouco desenvolvidas porque o meio de cultura utilizado é direccionado para os neurónios. A presença de aglomerados de células em certas matrizes dificulta o isolamento de um único neurónio na imagem.

Na Figura 5.16, apresenta-se uma outra imagem de uma célula neuronal na matriz de CS desalinhada, aos 2 divs.

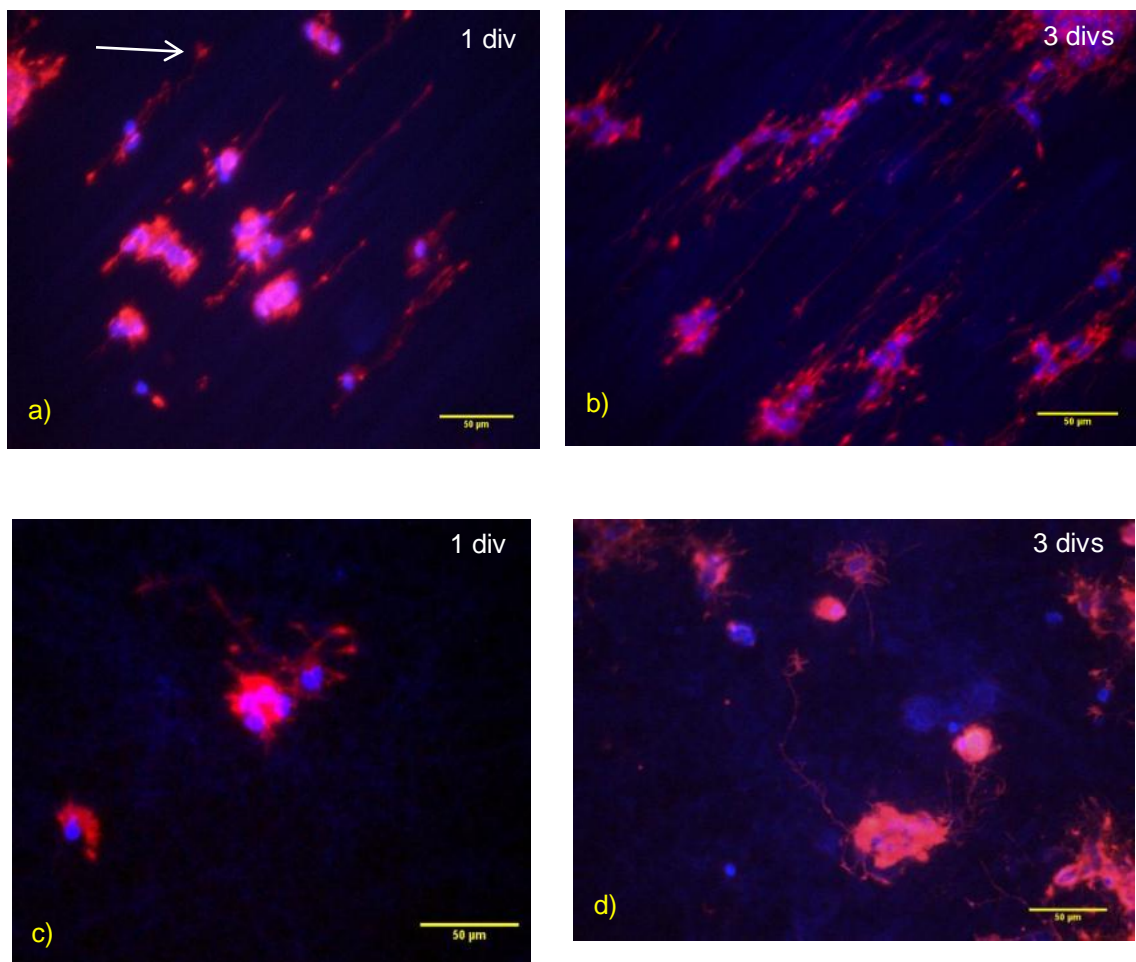


Figura 5.15 – Células neuronais cultivadas em matrizes de CS. a) Células com 1 dia de cultura, cultivadas em fibras alinhadas, sem PDL/Lam; b) Células com 3 dias de cultura, cultivada em fibras alinhadas, com PDL/Lam; c) Células com 1 dia de cultura, cultivadas em fibras desalinhadas, sem PDL/Lam; d) Célula com 3 dias de cultura, cultivada em fibras desalinhadas, com PDL/Lam.

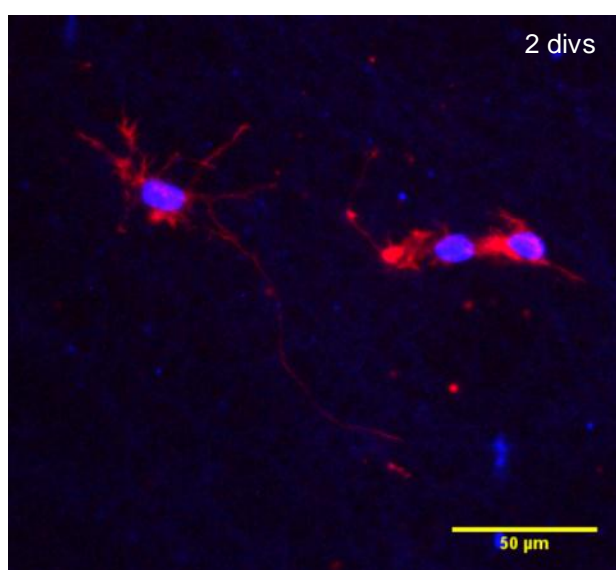


Figura 5.16 - Células cultivadas na matriz com fibras desalinhadas de CS, sem PDL/Lam ao 2º div.

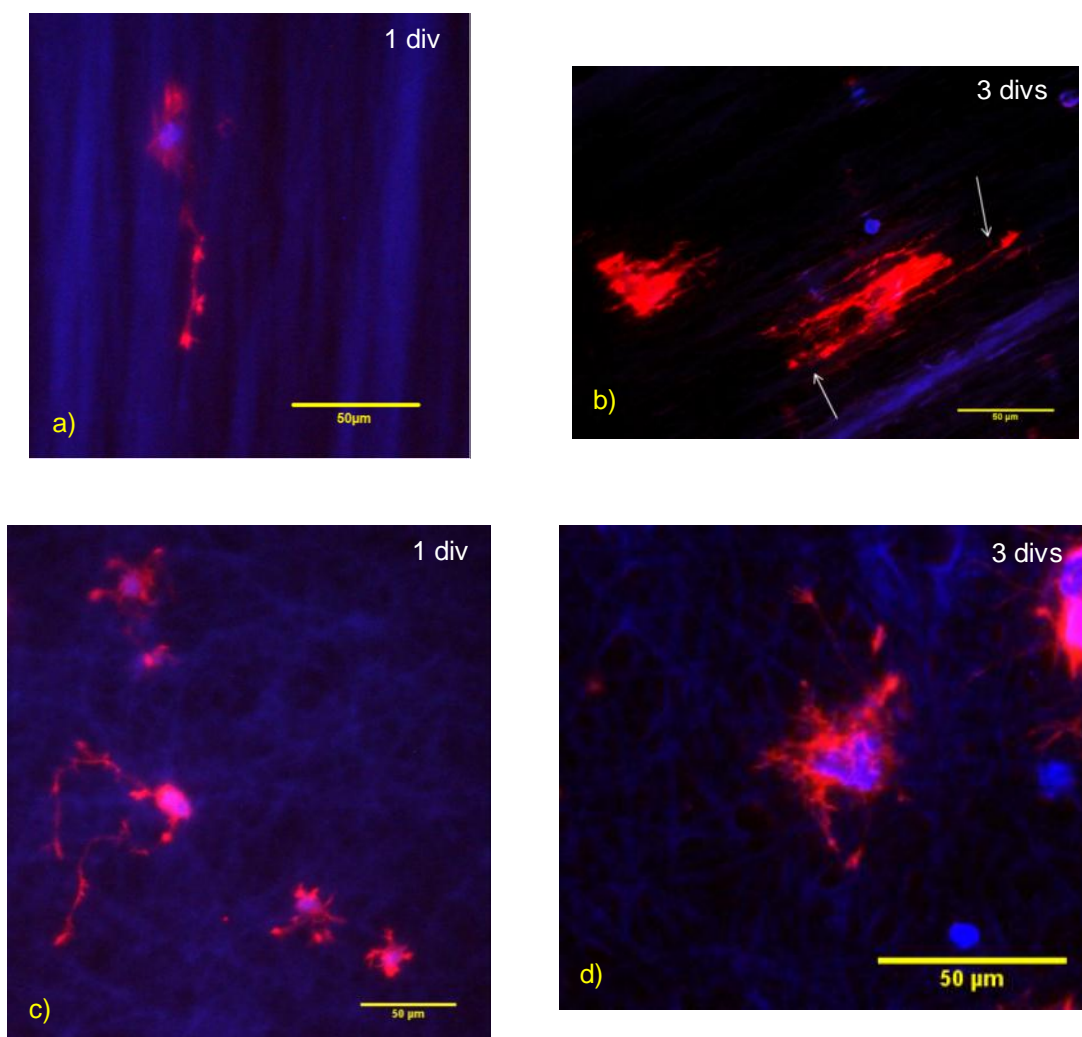


Figura 5.17 - Células neuronais cultivadas em matrizes de PCL/CS. a) Células com 1 dia de cultura, cultivada em fibras alinhadas, sem PDL/Lam; b) Células com 3 dias de cultura, cultivadas em fibras alinhadas, com PDL/Lam; c) Células com 1 dia de cultura, cultivadas em fibras desalinhadas, sem PDL/Lam; d) Células com 3 dias de cultura, cultivada em fibras desalinhadas, com PDL/Lam.

A Figura 5.17 refere-se a células cultivadas em matrizes de PCL/CS. Na imagem a) é já visível o crescimento do axónio segundo a direcção das fibras. São também visíveis cones de crescimento ao longo do axónio, um dos quais irá dar origem à arborização terminal. A imagem c) da mesma figura mostra dois núcleos muito próximos, dos quais partem os axónios, crescendo em direcções diferentes. Nas mesmas células são também visíveis ramificações do axónio. Encontram-se também outras células da neuroglia.

Na Figura 5.18 é notória a influência da morfologia das fibras na direcção de crescimento do axónio em matrizes de PCL/CS. Conseguem observar-se bem as fibras e também a adesão das neurites às mesmas. É visível um grande desenvolvimento do 1º para o 2º dia de cultura, comparando com a imagem a) da Figura 5.17.

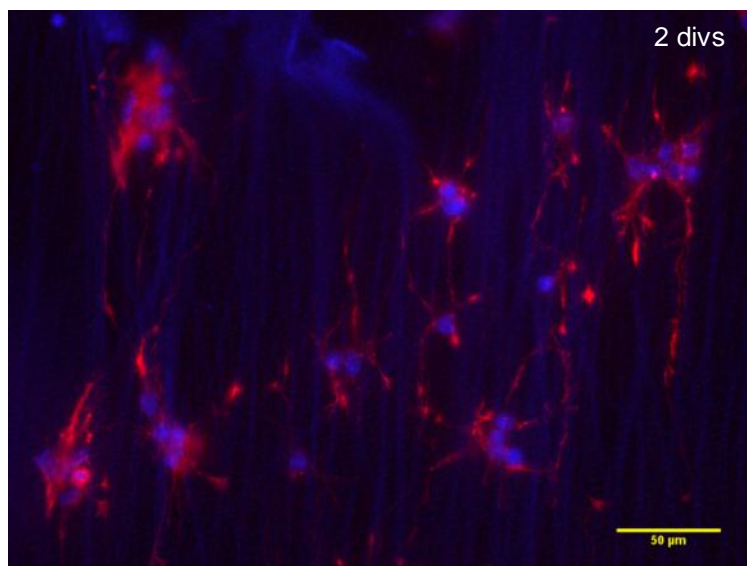


Figura 5.18 - Células cultivadas na matriz com fibras alinhadas de PCL/CS, sem PDL/Lam, ao 2º div.

Curiosamente, o aparecimento de ramificações axonais parece mais perceptível nas matrizes não alinhadas, como se pode observar, por exemplo, na Figura 5.15 d). Este facto pode ser devido ou a uma maior apetência dos neurónios cultivados sobre as matrizes não alinhadas de ramificarem mais, ou ao crescimento das ramificações ao longo das fibras alinhadas poder mascarar o seu número.

Para analisar o desenvolvimento celular no que diz respeito à extensão do axónio consideram-se situações correspondentes a 3 dias de cultura celular.

5.5.2.1 Análise da extensão do axónio tendo em conta a constituição polimérica das matrizes

O gráfico da Figura 5.19 coloca em evidência as diferenças no comprimento médio dos axónios de neurónios cultivados nas matrizes com diferentes constituições poliméricas.

Devido a dificuldades técnicas na realização das experiências, não foi possível apresentar resultados das matrizes de CS desalinhada sem PDL/Lam e PCL/CS desalinhada e alinhada, ambas sem PDL/Lam.

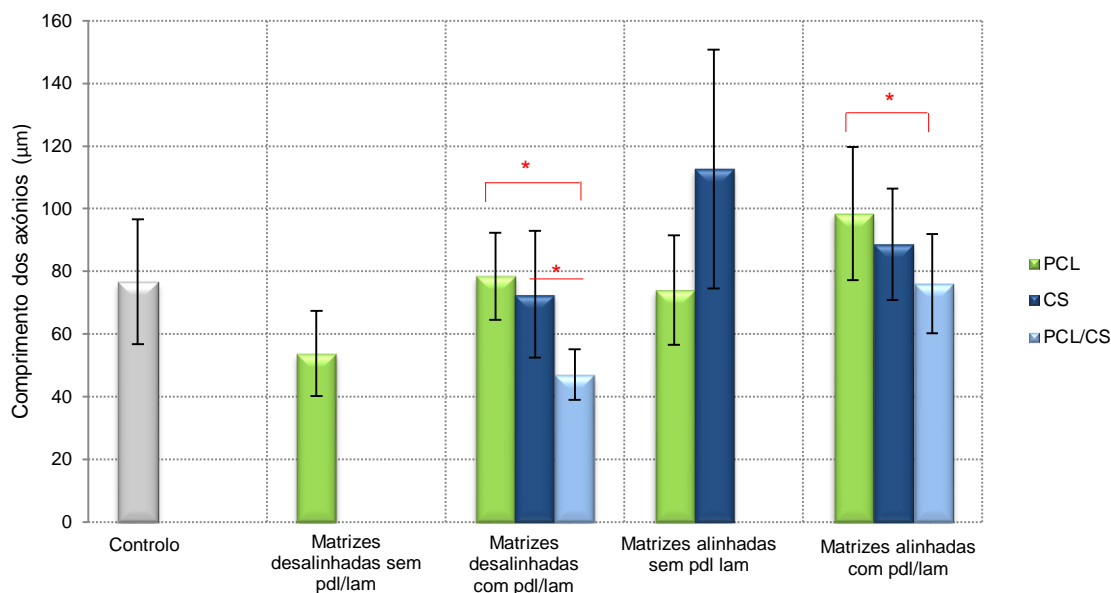


Figura 5.19 – Valores médios do comprimento do axónio para as matrizes com diferentes polímeros na sua constituição. * $p < 0,05$.

A análise dos resultados permite tirar as seguintes conclusões:

- Para matrizes revestidas com PDL/Lam, a matriz de PCL foi a que promoveu um maior crescimento dos axónios, tanto no caso das fibras desalinhadas como no caso das fibras alinhadas. Contudo, no caso das fibras desalinhadas, a média deste crescimento não é significativamente maior da obtida na lamela de controlo, que se refere a células que cresceram apenas sobre o vidro revestido com PDL/Lam. Por ordem decrescente da extensão do axónio em matrizes revestidas, à matriz de PCL segue-se a de CS e por fim a de PCL/CS.
- Quanto às matrizes não revestidas com PDL/Lam, os resultados obtidos evidenciam que a matriz de fibras alinhadas de CS apresenta maior valor médio para a extensão dos axónios do que a equivalente matriz de PCL.

5.5.2.2 *Análise da extensão do axónio tendo em conta o alinhamento das fibras nas matrizes*

Vimos anteriormente que o alinhamento influencia significativamente a direcção de crescimento dos axónios, que tendem a seguir a direcção das fibras da matriz. O gráfico da Figura 5.20 mostra valores médios para o comprimento do axónio, colocando em evidência a comparação entre fibras alinhadas e desalinhadas.

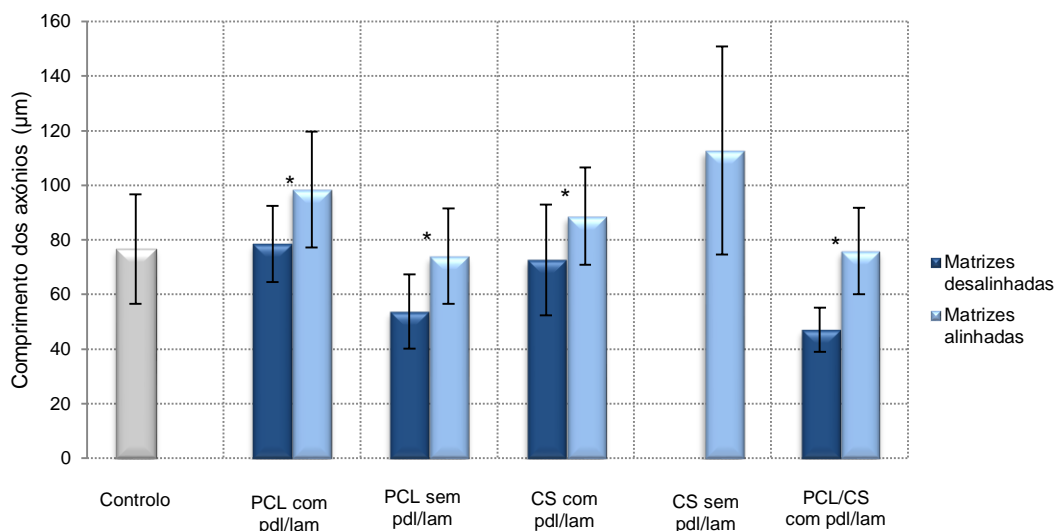


Figura 5.20 - Comparação do comprimento dos axónios em matrizes com fibras alinhadas e desalinhadas. * $p < 0,05$ entre matrizes alinhadas e desalinhadas.

A média do comprimento dos axónios das células cultivadas nas matrizes com fibras alinhadas é sempre superior à medida efectuada nas fibras com constituição semelhante mas orientadas aleatoriamente.

5.5.2.3 Análise do efeito do revestimento com PDL/Lam na extensão do axónio

A Figura 5.21 evidencia a comparação da extensão média dos axónios entre matrizes que diferem pela presença ou ausência do revestimento com PDL/Lam.

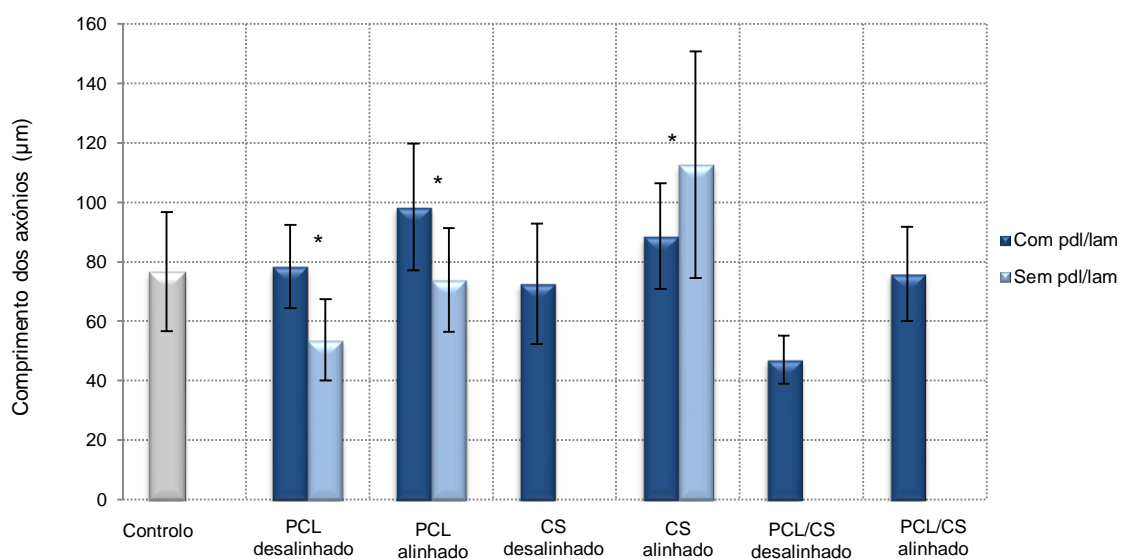


Figura 5.21 - Efeito do revestimento com PDL/lam no crescimento dos axónios, em fibras alinhadas e desalinhadas. * $p < 0,05$ entre matrizes com e sem revestimento de PDL/Lam

A análise do gráfico revela que:

- No caso das matrizes de PCL, é útil a utilização das proteínas PDL/Lam já que, em média, tanto para as matrizes com fibras desalinhasadas como para as de fibras alinhadas, o comprimento do axónio é maior para as células semeadas nas mesmas matrizes com PDL/Lam. Assim, a presença de proteínas providencia melhores condições para o desenvolvimento axonal neste substrato hidrofóbico.
- Para a matriz de CS com fibras alinhadas, a média do comprimento dos axónios é maior na ausência de revestimento de PDL/Lam do que na matriz revestida. Ambos os casos revelam valores superiores aos do controlo. Apesar da presença das proteínas se ter revelado benéfica no que diz respeito à adesão celular nesta matriz (ver resultados da Figura 5.12), a matriz potencia um maior crescimento do axónio quando não revestida. Tais resultados indicam que esta matriz é, por si só, um bom substrato para o desenvolvimento de células neuronais. Para além da hidrofiliidade, o reduzido diâmetro das fibras e as características eléctricas do CS poderão estimular o crescimento do axónio.

A matriz de CS com fibras alinhadas, sem PDL/Lam foi a que demonstrou proporcionar um melhor substrato para o desenvolvimento das células. Os axónios atingiram uma média de comprimento de, aproximadamente, 113 μm . Na Figura 5.22 pode ser observada a extensão dos axónios das células do hipocampo nesta matriz.

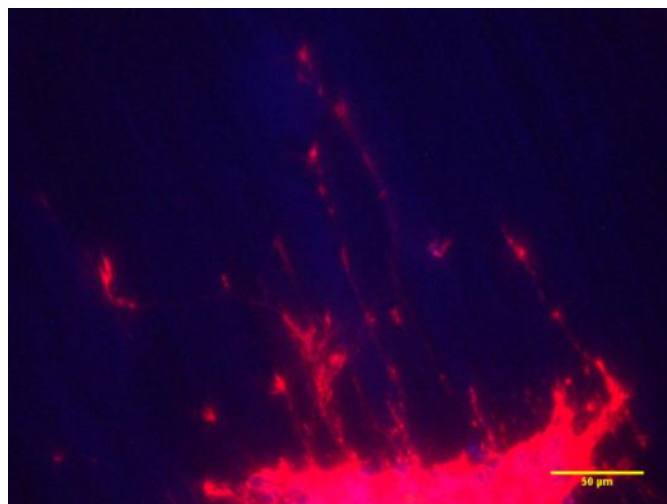


Figura 5.22 - Células neuronais cultivadas na matriz de CS com fibras alinhadas, sem PDL/Lam, ao 3^o div.

Capítulo 6



Conclusão

6. Conclusão

Este trabalho teve como principais objectivos o desenvolvimento de matrizes de nanofibras a partir de soluções de PCL e CS, com diferentes graus de alinhamento e verificar qual a influência dos materiais e da estrutura morfológica das fibras na adesão e desenvolvimento de células neuronais.

Foi possível obter fibras com diversos graus de alinhamento para todos os materiais utilizando um colector cilíndrico rotatório, variando a velocidade de rotação do mesmo.

Foi feita a análise morfológica das matrizes a partir de imagens de SEM, utilizando métodos estatísticos (medição de ângulos) e espectros de Fourier das imagens. O grau de alinhamento na direcção circunferencial do colector aumenta com a velocidade linear dos pontos da sua periferia e, portanto, da velocidade de rotação. O grau de alinhamento já é significativo para as fibras de PCL obtidas a velocidades de rotação relativamente baixas. No entanto, mesmo para as maiores velocidades testadas, há sempre algumas fibras angularmente dispersas. Para as fibras com CS consegue-se aumentar significativamente o grau do alinhamento com o aumento da velocidade de rotação. Esta característica assim como os menores diâmetros destas fibras devem-se a propriedades eléctricas do CS.

A porosidade das matrizes diminui com o grau de alinhamento, embora permaneça elevada.

A introdução de CS permite aumentar a hidrofiliabilidade das matrizes, o que é um aspecto importante do ponto de vista celular.

O estudo efectuado da cultura celular nas matrizes demonstra que, efectivamente, há variação no desenvolvimento celular de acordo com o substrato em que as células se encontram. Em todos os materiais o desenvolvimento é maior nas matrizes com fibras alinhadas do que nas desalinhadas. O axónio, assim como as dendrites, desenvolvem-se nas matrizes segundo a direcção das fibras. São de destacar os bons resultados obtidos para a adesão celular nas matrizes de CS mesmo sem a utilização das proteínas PDL/Lam.

Para as matrizes de PCL o revestimento com PDL/Lam ajudou na adesão celular tendo-se verificado uma média de comprimentos de axónios maior nas matrizes que continham as proteínas. O mesmo não sucedeu com a matriz de CS. A matriz de CS com fibras alinhadas não revestida foi a que apresentou os melhores resultados para o comprimento médio dos axónios. Assim, podemos concluir que, entre os casos analisados, a constituição da matriz em termos de polímero utilizado e a morfologia das fibras têm um maior impacto no crescimento neuronal do que a presença PDL/Lam.

Apesar de não ter conduzido aos melhores resultados, o PCL é ainda um material interessante pois com ele poder-se-ão controlar outros aspectos fundamentais da matriz tais como a taxa de degradação.

O estudo efectuado demonstra as potencialidades destas matrizes poliméricas tendo em vista a promoção do desenvolvimento neuronal. O CS demonstrou ser uma boa escolha para futura utilização em regeneração do tecido neuronal.

6.1 *Perspectivas futuras*

São necessários ainda muitos passos para que, um dia, se possa utilizar uma matriz para regeneração do tecido neuronal humano. Será necessário estudar o comportamento celular não apenas de células neuronais isoladas, mas também das restantes células da neuroglia. O estudo do efeito da utilização de factores de crescimento apropriados seria também um passo a seguir. Provavelmente o sucesso da regeneração neuronal do SNC só ocorrerá com uma adequada conjugação entre materiais, factores de crescimento e fármacos. Tanto no caso dos factores de crescimento como dos fármacos, as matrizes poliméricas poderão ter uma contribuição importante na sua libertação controlada.

A matriz de PCL poderá ser melhorada no aspecto da adesão celular. Para tornar a matriz mais hidrofílica poderão ser ainda considerados tratamentos por plasma e por hidrólise alcalina.

Seria também de grande interesse conseguir estimular a polarização axonal segundo um determinado sentido nas matrizes de fibras alinhadas, para que, deste modo, um maior número de axónios fosse guiado no sentido de restabelecimento de ligações em regiões lesadas de modo a formar uma rede neuronal funcional.

7. Bibliografia

1. Haoqing Cao, Ting Liu, Sing Yian Chew. The application of nanofibrous scaffolds in neural tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, Vol. 61, pp. 1055 – 1064.
2. Qianru He, Tianyi Zhang, Yumin Yang, Fei Ding. In Vitro biocompatibility of chitosan-based materials to primary culture of hippocampal neurons. *Journal of Materials Science: Mater Med*. 2009, Vol. 20, pp. 1457-1466.
3. Yee-Shuan Lee, Treena Livingston Arinzeh. Electrospun Nanofibrous Materials for Neural Tissue Engineering. *Polymers*. 2011, Vol. 3, pp. 413-426.
4. Poonam Verma, James Fawcett. Spinal Cord Regeneration. *Adv Biochem Engin/Biotechnol*. 2005, Vol. 94, pp. 43-66.
5. Molamma P. Prabhakaran, J. Venugopal, Casey K. Chan, S. Ramakrishna. Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Nanotechnology*. 2008, Vol. 19, p. 455108 (8pp).
6. Anuradha Subramanian, Uma Maheswari Krishnan, Swaminathan Sethuraman. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*. 2009, Vol. 16:108.
7. Molamma P. Prabhakaran, Jayarama Reddy Yenugopal, Tan Ter Chyan, Lim Beng Hai, Casey K. Chan, Aymeric Yutang Lim, Seeram Ramakrishna. Electrospun Biocomposite Nanofibrous Scaffolds for Neural Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part A*. 2008, Vol. 14 no.11, pp. 1787-1797.
8. Han BingWang, Michael E. Mullins, Jared M. Cregg, Andres Hurtado, Martin Oudega, Matthew T. Trombley, Ryan J. Gilbert. Creation of highly aligned electrospun poly-L-lactic acid fibers for nerve regeneration applications. *Journal of Neural Engineering*. 2009, Vol. 6.
9. Jingwei Xie, Matthew R. MacEwan, Andrea G. Schwartz and Younan Xia. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale*. 2010, Vol. 2, pp. 35-44.
10. F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*. 2005, pp. 2603-2610.
11. K., Saladin. *Anatomy and Physiology – The unit of form and function*. 3rd ed. s.l. : McGraw-Hill, 2003.
12. Dale Purves, George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, Leonard E. White. *Neuroscience*. 3rd ed. s.l. : Sinauer Associates, 2004.
13. Larry R. Squire, Darwin Berg, Floyd Bloom, Sascha du Lac, Anirvan Ghosh. *Fundamental Neuroscience*. 3rd ed. s.l. : Elsevier Inc., 2008.
14. James W. Fawcett, Richard. A. Asher. *The glial scar and central nervous system*

- repair. *Brain Research Bulletin*. 1999, Vol. 49 no.6, pp. 377-391.
15. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. s.l. : Garland Science, 2008.
 16. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. *Molecular Cell Biology*. 5th ed. s.l. : W. H. Freeman & Co, 2005.
 17. Sakmann, Bark. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *The EMBO Journal*. 1992, Vol. 11 no.6, pp. 2003-2016.
 18. Lubert Stryer, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko. *Biochemistry*. 5th ed. s.l. : W.H.Freeman, 2002.
 19. Takeshi Yoshimura, Nariko Arimura, Kozo Kaibuchi. Signaling network in neuronal polari-zation. *The Journal of Neuroscience*. 2006, Vol. 26 (42), pp. 10626 –10630.
 20. Carlos G. Dotti, Christopher A. Sullivan, Gary A. Banker. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of Neuroscience*. 1988, Vol. 8 (4), pp. 1454-1488.
 21. Brandt, Roland. Cytoskeletal mechanisms of axon outgrowth and pathfinding. *Cell Tissue Res*. 1998, Vol. 292, pp. 181-189.
 22. Paul M. B. Medina, Ryan J. Worthen, Lawrence J. Forsberg, Jay E. Brenman. The Actin-Binding Protein Capulet Genetically Interacts with the Microtubule Motor Kinesin to Maintain Neuronal Dendrite Homeostasis. 2008, Vol. 3 Issue 8.
 23. Farida Hellal, Andres Hurtado, Jörg Ruschel, Kevin C. Flynn, Claudia J. Laskowski, Martina Umlauf, Lukas C. Kapitein, Dinara Strikis, Vance Lemmon, John Bixby, Casper C. Hoogenraad, Frank Bradke. Microtubule Stabilization Reduces Scarring and Causes Axon Regeneration After Spinal Cord Injury. *Science*. 2011, Vol. 331, pp. 928-931.
 24. Brian W Guzik, Lawrence SB Goldstein. Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004, Vol. 16, pp. 443-450.
 25. Buddy D. Ratner, Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, Jack E. Lemons. *Biomaterials Science - An introduction to materials in Medicine*. 2nd Edition. s.l. : Elsevier Academic Press, 2004.
 26. Liu, Shu Q. *Bioregenerative Engineering – Principles and Applications*. s.l. : Wiley, 2007.
 27. Ying Yuan, Peiyun Zhang, Yuming Yang, Xiaodong Wang, Xiaosong Gu. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*. 2004, Vol. 25, pp. 4273 – 4278.
 28. Marianne Labet, Wim Thielemans. Synthesis of Polycaprolactone: a review. *Chemical So-ciety Reviews*. 2009, Vol. 38, pp. 3484-3504.
 29. Mr., Kasaai. A review of several reported procedures to determine the degree of Nacetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy.

- Carbohydrate Polymers. 2008, Vol. 71, pp. 497–508.
30. Gao Qun, Wan Ajun. Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution. *Carbohydrate Polymers*. 2006, Vol. 64, pp. 29-36.
31. Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 2006, Vols. 31, n°7, pp. 603-632.
32. Bin Duan, Cunhai Dong, Xiaoyan Yuan, Kangde Yao. Electrospinning of chitosan in acetic acid with poly(ethylene oxide). *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2004, Vol. 15 no.6, pp. 797-811.
33. Richard B. Borgens, Debra Bohnert. Rapid recovery from spinal cord injury after subcutaneously administered polyethylene glycol. *Journal of Neuroscience Research*. 2001, Vol. 66 Issue 6.
34. Dan Li, Younan Xia. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*. 2004, Vol. 16 no.14.
35. Andreas Greiner, Joachin H. Wendorff. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew. Chem. Int. Ed*. 2007, Vol. 46, pp. 5670-5703.
36. Nandana Bhardwaj, Subhas C. Kundu. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*. 2010, Vol. 28, pp. 325–347.
37. W E Teo, S Ramakrishna. A review on Electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology*. 2006, Vol. 17, pp. R89–R106.
38. Chantal Ayres, Gary L. Bowlin, Scott C. Henderson, Leander Taylor, Jackie Shultz, John Alexander, Todd A. Telemeco, David G. Simpson. Modulation of anisotropy in electro-spun tissue-engineering scaffolds: analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27(32), pp. 5524-5534.
39. Chris A. Bashur, Linda A. Dahlgren, Aaron S. Goldein. Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycol acid) meshes. *Biomaterials*. 2006, Vol. 27, pp. 5681-5688.
40. Chantal E. Ayres, B. Shekhar Jha, Hannah Meredith, James R. Bowman, Gary L. Bowlin, Scott C. Henderson, David G. Simpson. Measuring fiber alignment in electrospun scaffolds: a user's guide to the 2D fast Fourier transform approach. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*. 2008, Vols. 19, no5, pp. 603-621.
41. Polycaprolactone Mn 70,000-90,000 by GPC | Sigma Aldrich.com. http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=440744|ALDRICH&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC. [Online]
42. R. Gonzalez, R. Woods, S. Eddins. *Digital Image Processing Using Matlab*. 1st ed. s.l. : Prentice Hall, 2003.
43. Xinying Geng, Oh-Hyeong Kwon, Jinho Jang. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 5427-5432.
44. Jae Young Lee, Chris A. Bashur, Natalia Gomez, Aaron S. Goldstein, Christine E. Schmidt. Enhanced

polarization of embryonic hippocampal
Journal of Biomedical Materials Research
Part A. 2009, pp. 1398-140

neurons on micron scale electrospun fibers.