

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Microestruturas híbridas eletroativas
para a regeneração da medula espinhal

Fábio Manuel Ratana Rodrigues

Microestruturas híbridas eletroativas
para a regeneração da medula
espinhal

Fábio Manuel Ratana Rodrigues

Uminho | 2022

Outubro de 2022



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Fábio Manuel Ratana Rodrigues

**Microestruturas híbridas
eletroativas para a regeneração da
medula espinhal**

Dissertação de Mestrado

Em Biofísica e Bionanossistemas

Área de especialização: Engenharia de tecidos

Trabalho efetuado sob a orientação do

Professor Doutor Senentxu Lanceros-Mendez

Professora Doutora Clarisse Ribeiro

Outubro de 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne os direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada. Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

License granted to users of this work:



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Braga, 31 de outubro de 2022

Assinado por: **Fábio Manuel Ratana Rodrigues**
Num. de Identificação: 15346538
Data: 2023.01.06 00:23:58+00'00'

(Fábio Manuel Ratana Rodrigues)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado de fevereiro de 2022 a abril de 2022, no âmbito do Programa ERASMUS no Centro Basco de Materiais (BCM), Aplicações e Estruturas e na Universidade do País Basco, e, no restante período, na Universidade do Minho.

Antes de mais, gostaria de agradecer à minha orientadora, a Doutora Clarisse Ribeiro, por toda a disponibilidade e tempo que dedicou para me ajudar neste extenso trabalho que durou meses; assumidamente, não poderia pedir melhor tutora.

Quero também agradecer ao meu orientador, Doutor Senentxu Lanceros-Mendez, por me ter aceitado no grupo e sugerido o programa ERASMUS em Bilbao, uma experiência enriquecedora que, decerto, voltarei a repetir.

À Doutora Cármen Tubio, por me receber e acompanhar o meu trabalho durante os 3 meses de estância no BCM.

Aos meus companheiros de Bilbao, Udane, Marina y Josu por terem tornado a experiência de mobilidade muito mais preenchida e enriquecedora.

Quero também agradecer a todos os que me acompanharam do instituto da Biosustentabilidade (IB-S) e no BCM, especialmente ao Mestre Ander Garcia pelo apoio e dedicação na parte da impressão 3D e à Mestre Teresa Almeida pelo apoio prático nos ensaios de proliferação e tratamento de dados.

Por fim, mas não menos importante, tenho o prazer de agradecer a todos os meus amigos, que me acompanharam nestes dois anos de mestrado, e, em especial, à minha família pelo apoio constante e incansável.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Braga, 31 de outubro de 2022

Assinado por: **Fábio Manuel Ratana Rodrigues**
Num. de Identificação: 15346538
Data: 2023.01.06 00:25:52+00'00'

(Fábio Manuel Ratana Rodrigues)

Resumo

A medula espinhal é um elemento essencial do sistema nervoso central. Quando ocorre a lesão traumática da medula espinhal (LTME) os processos regenerativos ocorrem de forma a não reestruturar as funções que lhe são atribuídas, originando perda de função motora e sensorial.

A engenharia de tecidos aponta para desenvolver novos prognósticos para esta patologia restituindo as funções originais da medula espinhal. Uma das estratégias já conhecidas para regeneração de tecidos é a incidência de estímulos elétricos para adesão e orientação aquando do crescimento celular.

Neste estudo foi desenvolvido um compósito de poli(vinilideno) (PVDF, do inglês, *polyvinylidene fluoride*), uma estrutura coberta de pilares piezoelétricos que irão através do movimento gerar um sinal elétrico para as células neuronais na sua superfície. Este compósito tem também na sua constituição nanopartículas superparamagnéticas, que vão permitir através de um campo magnético o movimento dos pilares que, por sua vez, origina o impulso elétrico. A este compósito 4D foi adicionado um hidrogel de alginato de sódio oxidado covalentemente ligado a proteínas RGD, um fator bioquímico que auxilia na fixação celular. O hidrogel tem a característica de se degradar à medida que as células proliferam e se diferenciam. Levando-as a receber os estímulos elétricos aquando já totalmente diferenciadas. Os compósitos magnetoelétricos (ME) têm a particularidade de gerarem corrente elétrica a partir de um estímulo magnético permitindo que este estímulo seja incidido nas células ao mesmo tempo que o tecido regenera.

Várias técnicas foram utilizadas para estudar este sistema complexo, onde se denotou moção dos pilares por cisalhamento, a presença da fase β em mais de 80% do composto, uma percentagem de ferrites de 9,1%, e crescimento no ensaio de proliferação superior a 25%.

Através de uso de compósitos eletroativos pretende-se melhorar e inovar este tratamento, com uso de hidrogéis *in situ* e interações elétricas não invasivas, aumentando a viabilidade celular, bem como controlando a diferenciação e orientação do crescimento neuronal após o implante.

Engenharia de tecidos, Hidrogel, Impressão 3D, Medula Espinhal, Piezoelectricidade

Abstract

The spinal cord is an essential element in the central nervous system. When traumatic spinal cord injury (LTME, from the Portuguese *Lesão Traumática da Medula Espinhal*) occurs, regenerative processes occur in a way that does not restructure the functions assigned to it, resulting in loss of motor and sensory function.

Tissue engineering aims to develop new prognoses for this pathology, restoring the original functions of the spinal cord. One of the strategies already known for tissue regeneration is the incidence of electrical stimuli for adhesion and orientation during cell growth.

In this study, a PVDF scaffold was developed, a structure covered with piezoelectric pillars that will, through movement, generate an electrical signal for the neuronal cells on its surface. This scaffold also has superparamagnetic nanoparticles in its constitution, which will allow the movement of the pillars through a magnetic field, which, in turn, gives rise to the electrical impulse.

To this 4D scaffold, a hydrogel of oxidized sodium alginate covalently linked to RGD proteins, a biochemical factor that aids in cell attachment, was added to its surface. The hydrogel has the characteristic of degrading as cells proliferate and differentiate. Leading them to receive electrical stimuli when already fully differentiated. Magnetoelectric composites have the particularity of generating electric current from a magnetic stimulus, allowing this stimulus to be applied to the cells while the tissue regenerates.

Several techniques were used to study this complex system, which denoted motion of the pillars by shear, the presence of the β phase in more than 80% of the compound, a percentage of ferrites of 9.1%, and growth in the proliferation assay greater than 25%.

Through the use of electroactive scaffolds, it is intended to improve and innovate this treatment, with the use of *in situ* hydrogels and non-invasive electrical interactions, increasing cell viability, as well as controlling the differentiation and orientation of neuronal growth after implantation.

Tissue engineering, Hydrogel, 3D Printing, Spinal Cord, Magnetoelectric composites

Índice

RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS	XI
1.1 INTRODUÇÃO.....	2
1.2 OBJETIVOS	3
1.3 ESTRUTURA DA TESE	4
2.0 ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	5
2.1 SISTEMA NERVOSO: MEDULA ESPINHAL	6
2.2 LESÃO TRAUMÁTICA DA MEDULA ESPINHAL	8
2.3 INTERVENÇÕES TERAPÊUTICAS NA LESÃO TRAUMÁTICA DA MEDULA ESPINHAL.....	11
2.4 ENGENHARIA DE TECIDOS	12
2.4.1 <i>Propriedades dos scaffolds</i>	12
2.4.2 <i>Hidrogéis</i>	16
2.5 BIOMATERIAIS ELETROATIVOS E BIORREACTORES	17
2.5.1 <i>Polímeros eletroativos</i>	17
2.5.2 <i>Compósitos magnetoativos</i>	19
2.6 ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA DE TECIDOS PARA REGENERAÇÃO DE MEDULA ESPINHAL: ESTADO DE ARTE. 21	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 PRODUÇÃO DOS PILARES	25
3.1.1 <i>Impressão 3D dos moldes dos scaffolds</i>	25
3.1.2 <i>Síntese dos pilares eletroativos com e sem Fe₃O₄</i>	25
3.2 PRODUÇÃO DO HIDROGEL	26
3.2.1 <i>Oxidação do Alginato de Sódio</i>	26
3.3 CARACTERIZAÇÕES DOS MATERIAIS	27
3.3.1 <i>Microscopia eletrônica de varrimento</i>	27
3.3.2 <i>Goniômetro de ângulo de contato</i>	28
3.3.3 <i>Teste de Absorção</i>	28
3.3.4 <i>Espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier – Reflexão total atenuada</i>	29
3.3.5 <i>Calorimetria diferencial de varrimento</i>	30
3.3.6 <i>Magnetômetro de amostra vibratória</i>	31
3.3.7 <i>Análise mecânica dinâmica</i>	32
3.3.8 <i>Caracterização por Raios-X</i>	32
3.3.9 <i>Inserção do fator bioquímico RGD no OSA</i>	32
3.3.10 <i>Síntese do hidrogel de OSA/SA nos pilares</i>	33
3.4 ENSAIOS CELULARES	33
3.4.1 <i>Esterilização das amostras</i>	33
3.4.2 <i>Cultura celular</i>	34
3.4.4 <i>Proliferação celular</i>	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

4.1	MICROSCOPIA ELETRÓNICA DE VARRIMENTO	37
4.2	GONIÓMETRO DE ÂNGULO DE CONTACTO	40
4.3	TESTE DE ABSORÇÃO.....	41
4.4	MAGNETÓMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE	42
4.5	RAIOS X DO OSA E SA	44
4.6	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO TRANSFORMADA DE FOURIER – REFLEXÃO TOTAL ATENUADA...	44
4.7	CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO	47
4.8	ANÁLISE MECÂNICA DINÂMICA.....	49
4.9	CITOTOXICIDADE	50
4.10	PROLIFERAÇÃO	51
5.	CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO	53
5.1	CONCLUSÕES	54
5.2	TRABALHO FUTURO	54

Lista de siglas e abreviaturas

AC – Corrente alternada, do inglês, *Alternated Current*

ATP – trifosfato de adenosina, do inglês, *adenosine triphosphate*

CSPG – proteoglicanos de sulfato de condroitina, do inglês, *chondroitin sulfate proteoglycans*

DNA – ácido desoxirribonucleico, do inglês, *deoxyribonucleic acid*

DSC – Scan dinâmico de calorimetria, do inglês, *Dynamic Scanning Calorimetry*

DMA – Análise Mecânica Dinâmica, do inglês, *Dynamic Mechanical Analysis*

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido, do inglês, *Dimethyl sulfoxide*

FTIR – Infra-vermelhos transformados de Fourier, do inglês, *Fourier Transform InfraRed*

FTIR-ATR - Infra-vermelhos transformados de Fourier – Reflexão total atenuada, do inglês, *Fourier Transform InfraRed – Attenuated Total Reflectance*.

LCST – menor temperatura de solução crítica, do inglês, *lower critical solution temperature*

LTME – Lesão traumática da medula espinhal

ME – Magneto elétrico

MEC – Matriz extracelular

MSC – células estaminais mesenquimais, do inglês, *mesenchymal stem cells*

PBS – Solução tampão fosfato, do inglês *phosphate buffer saline*

PLLA – Poli-(L) ácido láctico, do inglês, *Poly-(L)-Lactic Acid*

PVDF – fluoreto de polivinilideno, do inglês *PolyVinyliDene Fluoride*

PTP – proteína tirosina fosfatase, do inglês, *protein tyrosine phosphatase*

RGD – Polipéptido de ariginina (R), glicina (G), aspartato (D)

ROS – Espécies reativa de oxigênio do inglês, *reactive oxigen species*

VSM – Magnetômetro de amostra vibratória, do inglês, *Vibrating Sample Magnetometer*

OSA – Alginato de Sódio Oxidado, do inglês *Oxidized Sodium Alginate*

SA – Alginato de Sódio, do inglês *Sodium Alginate*

SEM – Microscopia Eletrônica de Varrimento, do inglês *Scanning Electron Microscopy*

Lista de figuras

Figura 1 - Visão lateral da medula espinhal ao longo das vertebrae da coluna.	6
Figura 2 - Visão anterior da medula espinhal ao longo das vertebrae da coluna.	7
Figura 3 - Corte transversal da medula óssea	8
Figura 4 – Lesão traumática da medula espinhal: (a) Fase Aguda (Nas primeiras 48 horas); (B) Fase subaguda (Entre os 2 e os 14 dias); e (C) Fase intermédia (entre os 14 dias e os 6 meses) e crónica (após os 6 meses).....	10
Figura 5 – Esquema dos principais tipos de <i>scaffolds</i> usados em engenharia de tecidos	16
Figura 6 - Representação esquemática da conformação em cadeia das fases α lfa, beta e gama do PVDF.....	19
Figura 7 – Comportamento das nanopartículas de ferro e superparamagnéticas na presença e ausência de campo externo a) Representação gráfica da coercividade em relação ao tamanho da nanopartícula.....	20
Figura 8 – Esquema de síntese dos pilares de PVDF.....	25
Figura 9 - Imagem ilustrativa da constituição do microscópio eletrónico de varrimento.....	27
FIGURA 10 - IMAGEM ILUSTRATIVA DO PROCESSO DO TESTE DE ABSORÇÃO.....	28
Figura 11 - Ilustração do funcionamento do FTIR-ATR.	29
Figura 12 - Ilustração dos constituintes e funcionamento do VSM.....	31
Figura 13 - Estrutura da molécula de RGD (arginina-glicina-aspartato).....	33
Figura 14 - Ilustração com a representação estrutural do alginato e a sua conformação após polimerizado com o cloreto de cálcio.	33
Figura 15 - Imagens retiradas por SEM dos pilares de: A) PLA ampliado 27x, B) PLA+SEBS ampliado 42x, C) PVDF pequenos ampliado 200x, D) PVDF grandes ampliados 100x, E) PVDF grandes com Fe_3O_4 , e F) PVDF pequenos com Fe_3O_4	37
Figura 16 - Representação gráfica da: a) altura, b) largura e c) espaçamento médio dos pilares de PVDF.....	38
Figura 17 - Imagens retiradas por SEM, ampliadas 1500x, dos pilares de PVDF desenvolvidos: a) grandes magnéticos e b) grandes de controlo.....	39
Figura 18 Gráfico representativo do ângulo de contacto dos pilares pequenos de controlo e magnéticos.....	40
Figura 19 - Gráfico de barras do teste de absorção dos pilares pequenos de controlo e magnéticos. M_i é a massa inicial e M_f a massa final.	41
Figura 20 - Gráfico de scan de VSM dos pilares magnéticos pequenos.....	42
Figura 21 - Gráfico d scan de VSM das nanopartículas de Fe_3O_4	43

Figura 22 - Scan de Raios-X do alginato de sódio e do alginato de sódio oxidado.	44
Figura 23 - Análise por FTIR-ATR do alginato de sódio (SA), alginato de sódio oxidado (OSA) e alginato de sódio oxidado ligado ao RGD (OSA+RGD).	45
Figura 24 - Gráfico do scan de FTIR-ATR das amostras de controlo e magnéticas, com evidência aos picos α e β	46
Figura 25 - Gráfico de Fluxo de calor em função da temperatura das diferentes amostras produzidas, obtido por DSC.	48
Figura 26 - Gráficos de análise por DMA de: (A) controlo grande, (B) Controlo pequeno, (C) Magnético grande, e (D) Magnético pequeno.	50
Figura 27 - Viabilidade celular obtida através do ensaio de citotoxicidade com as células SH-SY5Y em contacto com o meio exposto às diferentes amostras.	51
Figura 28 - Avaliação do crescimento na proliferação celular das 24 às 48 horas nas amostras de pilares magnéticos e de controlo (células em contacto com o poço de poliestireno).....	52

Lista de tabelas

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DOS QUAIS FORAM RETIRADOS OS VALORES, BEM COMO A TRANSMITÂNCIA, ABSORVÂNCIA E O VALOR FINAL DE FRAÇÃO RELATIVA DE FASE BETA	46
TABELA 2 – ENTALPIA DE FUSÃO, PICO DA ENTALPIA E GRAUS DE CRISTALINIDADE DAS DIVERSAS AMOSTRAS OBTIDAS POR DSC.	48

Capítulo I: Introdução

1.1 Introdução

O termo engenharia de tecidos foi usado pela primeira vez em 1984, numa publicação que descreveu a organização de uma membrana semelhante ao endotélio na superfície de uma prótese oftálmica sintética de implante longo¹. A origem do termo engenharia de tecidos e do conceito como o conhecemos hoje pode ser atribuído ao pioneiro da bioengenharia Y.C. Fung da Universidade da Califórnia em São Diego que liderou a apresentação de uma proposta mal sucedida em 1985 para um prêmio do Programa de Centro de Pesquisa em Engenharia sob o título “Centro para a Engenharia de Tecidos Vivos”.² A proposta foi apresentada novamente em 1987 numa conferência, o que despoletou um forte interesse no conceito dentro da NSF (*National Science Foundation*), e que levou a uma reunião especial sobre engenharia de tecidos no outono de 1987 e depois em 1988, a primeira reunião científica formal deste campo emergente. Nos dois anos seguintes, foram organizados um workshop e um simpósio que o ajudaram a estimular a literatura científica com este novo conceito², que foi posteriormente publicado num artigo de revisão em 1993 por Robert Langer e Joseph Vacanti. Nessa altura, a engenharia de tecidos foi descrita como uma nova área que aplicava os princípios da biologia e da engenharia no desenvolvimento de substitutos biológicos que têm como objetivo restaurar, manter ou melhorar a função de um órgão/tecido.³

A partir de 1987, o número de investigadores a trabalhar na área de engenharia de tecidos cresceu substancialmente. Esse aumento deveu-se à entrada de investigadores recém-formados no campo, mas também pelo facto de investigadores já estabelecidos começarem a reconhecer as suas linhas de trabalho existentes como engenharia de tecidos. Para além disso, com o alargamento do tema abrangido desta área, campos adjacentes relataram avanços que abordavam os principais desafios da engenharia de tecidos.

Atualmente, a engenharia de tecidos é um mercado com um valor estimado de 9,2 mil milhões de euros, com uma perspetiva de crescimento de 12% até 2030 ⁴². Está dividido nas diferentes aplicações clínicas, nomeadamente: ortopédica e musculoesquelética, neurológica, cardiovascular, pele e tecido tegumentar, dentes, entre outros.

Apesar do rápido crescimento nos últimos 30 anos, a engenharia de tecidos ainda enfrenta algumas barreiras que impedem a sua funcionalidade total nos tecidos vivos, assim, novas estratégias emergentes são necessárias para fazer face aos obstáculos presentes, uma delas é o uso de materiais ativos.

Os materiais ativos são materiais que alteram as suas propriedades físico-químicas em resposta a um estímulo externo específico, seja ele uma variação de temperatura, humidade ou pH, a presença de luz ou a aplicação de uma carga mecânica, campo elétrico ou magnético.

Assim, estes materiais caracterizam-se pela capacidade de, não só sentir o meio que os rodeia, como também de responder a estímulos provenientes do mesmo. Estes materiais têm sido cada vez mais usados na área da engenharia de tecidos, uma vez que estes podem fornecer diferentes tipos de estímulos, dependendo do tipo de material usado, como por exemplo estímulos elétricos e mecânicos. Esta abordagem tem demonstrado ser muito promissora, nomeadamente para aplicação em tecidos e/ou órgãos que no corpo humano estão sujeitos a este tipo de estímulos, nomeadamente o osso, músculo esquelético e cardíaco, e também os neurónios.⁴

As células do sistema nervoso são conhecidas pela sua capacidade de comunicação através de estímulos elétricos e químicos. Isto ocorre tanto entre neurónios como entre os nervos e as células musculares. Estímulos elétricos podem percorrer toda a extensão do corpo em menos de um segundo, induzindo contração muscular ou causando a libertação de substâncias para regular funções corporais. É, portanto, um fator importante e constante na comunicação entre o organismo e na função e desenvolvimento dos neurónios. Uma vez que eles reagem responsivamente a estímulos elétricos circundantes e direcionados, a abordagem de um compósito capaz de recriar um microambiente elétrico que forneça estes estímulos aparenta tornar-se em algo promissor.

Assim, neste estudo, pretende-se desenvolver um compósito ME (transforma um estímulo magnético num elétrico e vice-versa) para a proliferação de neurónios e posteriormente para a regeneração da medula espinhal.

1.2 Objetivos

O objetivo desta tese foi desenvolver um compósito ME biocompatível para reparação e regeneração da medula espinhal. Este compósito irá ser coberto com um hidrogel de degradação rápida para auxiliar a adesão durante a proliferação dos neurónios. Após a degradação do hidrogel, e durante a diferenciação, os neurónios estarão em contacto direto com o compósito ME, recebendo os estímulos elétricos diretamente. Todos os materiais utilizados terão de ser biodegradáveis ou biocompatíveis, bem como os subprodutos de degradação. Para alcançar este objetivo, será necessário:

Desenvolver e caracterizar um novo tipo de compósito com pilares e nanopartículas de Fe_3O_4 por impressão 3D, para estimular as células neuronais. Caracterizar as amostras desenvolvidas quanto à sua magnetização, resistência mecânica, hidrofiliabilidade, composição química, absorção e finalmente os ensaios celulares.

Sintetizar e caracterizar um hidrogel de alginato de sódio oxidado com fatores bioquímicos para ajudar na proliferação e adesão celular.

Testar a citotoxicidade do compósito desenvolvido e a sua influência em ensaios de proliferação celular.

Segundamente, foi sintetizado um hidrogel de alginato de sódio oxidado, e ligado covalentemente a fatores bioquímicos de adesão celular. O objetivo do hidrogel é melhorar a adesão e viabilidade celular na fase de proliferação dos neurónios, para que após esta fase, o hidrogel degrade e os neurónios estejam em contacto com o compósito ME e recebam os estímulos elétricos para auxiliar e promover a diferenciação.

1.3 Estrutura da tese

A tese está dividida em 5 capítulos.

O primeiro capítulo contém uma contextualização do tema e do problema em questão, os objetivos e a estrutura da tese.

No segundo capítulo aborda-se a constituição e as várias etapas da LTME, bem como uma introdução à engenharia de tecidos e as diversas estratégias nesta área para recuperar os tecidos totalmente ou parcialmente danificados. Contém também temas como a piezoelectricidade, o magnetismo de nanopartículas, funcionamento de biorreatores e o estado de arte de atuais soluções para a regeneração da medula espinhal.

O terceiro capítulo contém a descrição dos materiais e métodos utilizados para a síntese e caracterização dos vários componentes do compósito criado. Contém também a explicação teórica de cada método e o processamento dos dados que serão depois apresentados no próximo capítulo.

No quarto capítulo, são apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização dos materiais e dos ensaios celulares. Para além disso, estes resultados são discutidos e comparados com o conhecimento pré-existente na literatura.

O quinto capítulo finaliza com a conclusão de todo o trabalho realizado, bem como a sugestão de continuação do projeto em trabalho futuro.

Capítulo II: Enquadramento teórico

2.1 Sistema Nervoso: Medula espinhal

A medula espinhal está inserida no interior da coluna vertebral sendo um componente fundamental do sistema nervoso central. É uma estrutura cilíndrica alongada que se estende desde o nível do forame magno, através do canal vertebral, até a borda superior da primeira ou segunda vértebra lombar.⁵

A coluna vertebral está dividida em: 7 vertebbras cervicais, 12 torácicas, 5 lombares e 5 sacrais, sendo finalizadas pelos ossos coccígeos, comumente denominado de cóccix.⁶

A medula espinhal tem uma superfície relativamente lisa com fissuras longitudinais nas faces anterior e posterior, percorridas por 31 emanações laterais regulares de pares de nervos dos dois lados da medula espinhal, designados de segmentações.

A coluna vertebral apresenta apenas 30 vértebras interforaminadas. As segmentações estão presentes entre cada vértebra, no final do cóccix e na parte superior do atlas.³ O número de vértebras e segmentos da medula são iguais nos níveis torácico, lombar, sacral e coccígeo, mas, em vez dos sete esperados, são oito segmentos na coluna cervical (Figura 1).

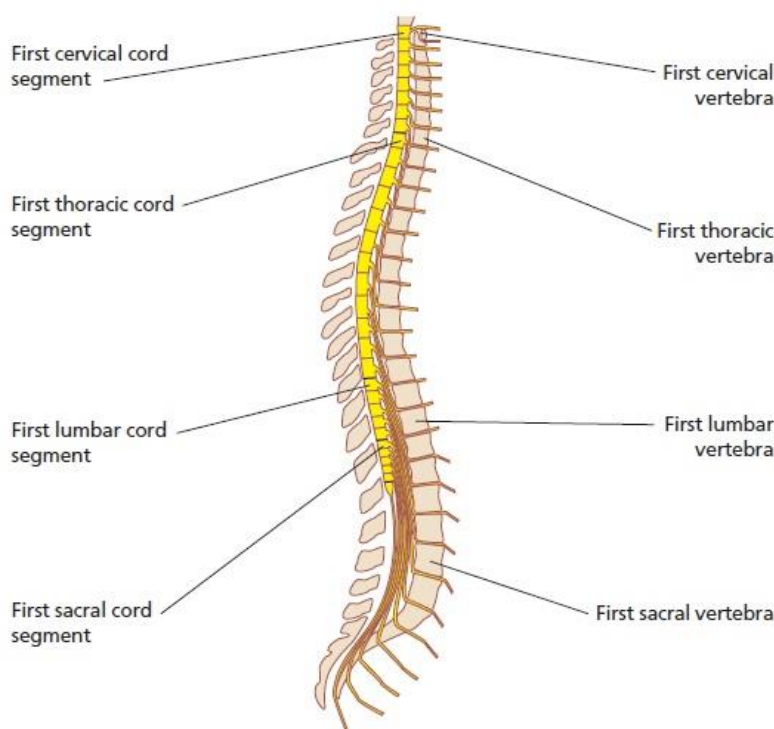


FIGURA 1 - VISÃO LATERAL DA MEDULA ESPINHAL AO LONGO DAS VERTEBRAS DA COLUNA.²

Existem duas regiões da medula espinhal que são aumentadas fusiformemente: a cervical e a lombar. Estas regiões são as que contêm mais matéria cinzenta na medula espinhal, devido ao maior número de nervos necessários para inervar os músculos. O alargamento

cervical dá origem ao plexo braquial, que atende os membros superiores, enquanto o alargamento lombar dá origem ao plexo lombossacral, que tem a sua distribuição nos membros inferiores. O aspe to distal do cordão tem uma redução da sua espessura numa forma cônica chamada *connus medullaris* (Figura 2) abaixo do alargamento lombar, e o *filium terminale* desce da ponta do cone. Abaixo do nível da segunda vértebra lombar, onde termina a medula, as raízes nervosas continuam caudalmente e saem pelos forames intervertebrais. Este aglomerado descendente de raízes nervosas é denominado cauda equina.²

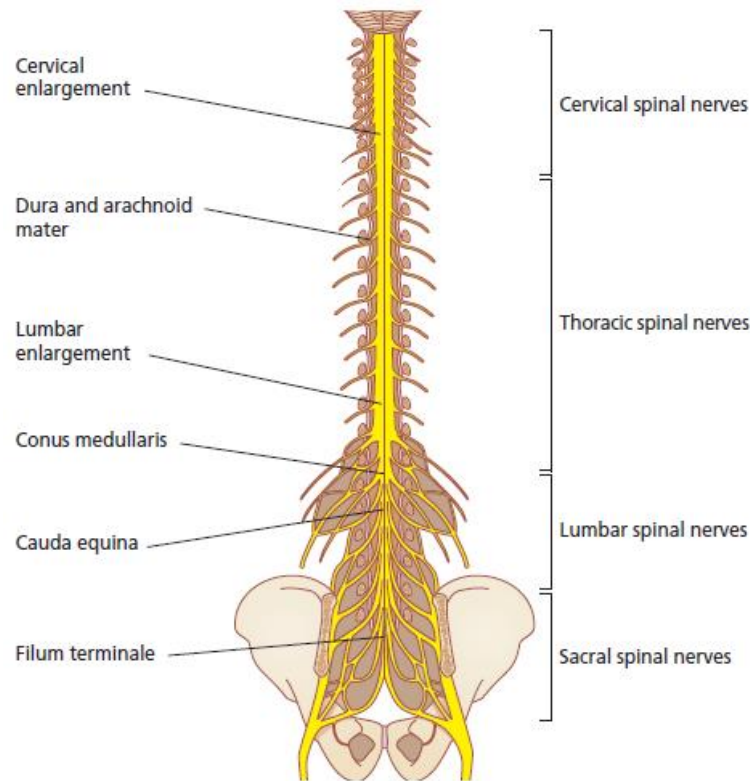


FIGURA 2 - VISÃO ANTERIOR DA MEDULA ESPINHAL AO LONGO DAS VERTEBRAS DA COLUNA.²

Uma vista transversal da medula espinhal demonstra uma matéria cinzenta em forma de 'H' cercada por uma substância branca (Figura 3). A matéria "H" cinzenta é constituída por células nervosas, axônios e dendritos, enquanto a matéria branca consiste em tratos axonais mielinizados e não mielinizados que percorrem longitudinalmente.

Existem seis colunas, ou funículos, cada uma contendo os tratos motores ascendentes, sensoriais e descendentes. Essas colunas - os funículos anterior, lateral e posterior - são separadas lateralmente pelos sulcos póstero-laterais e ântero-laterais, ou sulcos, anteriormente pelo sulco mediano anterior e posteriormente pelo sulco mediano posterior.²

Existe proporcionalmente mais massa cinzenta nas seções lombossacrais porque a maior massa muscular nas extremidades inferiores requer maior inervação.² Em contraste, há muito mais matéria branca vista em cortes cervicais devido à presença de fibras de conexão que abrangem todo o cordão, ligando todas as regiões do corpo com o cérebro. A substância branca da região lombossacra contém apenas fibras que atendem à extremidade caudal do cordão. Um exame atento da substância cinzenta mostra que ela é dividida em dez seções chamadas lâminas de Rexed. As lâminas posteriores desempenham um papel integral na recepção e modulação sensorial, enquanto as lâminas anteriores ajudam a inervar os músculos.⁸

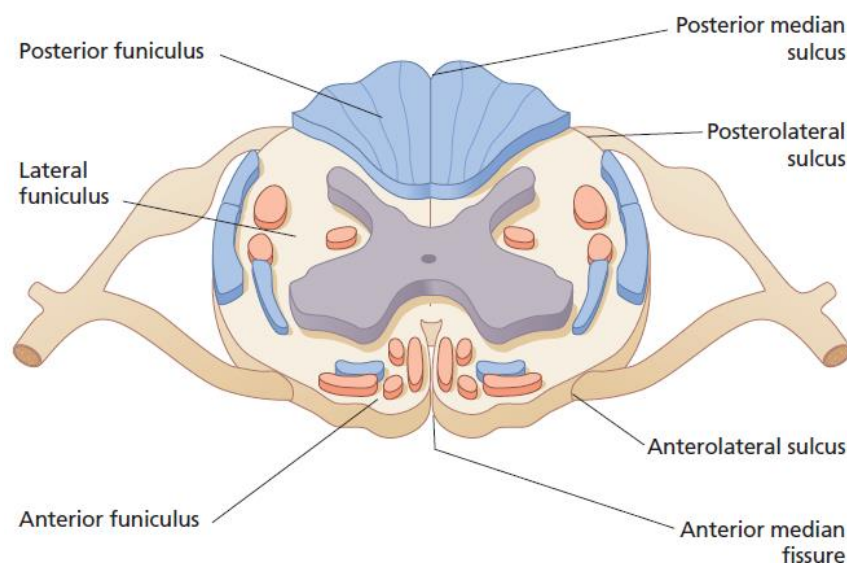


FIGURA 3 - CORTE TRANSVERSAL DA MEDULA ÓSSEA.²

A medula espinhal está protegida por 3 membranas, sendo estas: *dura-máter*, *araquenóide*, e *pia mater*, organizadas da mais exterior para a mais próxima da medula.²

2.2 Lesão traumática da medula espinhal

A Lesão traumática da medula espinhal (LTME) é uma doença traumática desafiante que na maioria dos casos leva a perdas de funções motoras e sensoriais permanentes. Esta é uma doença difícil de tratar devido à presença de múltiplos mecanismos secundários.⁹

A LTME é caracterizada por um impulso traumático inicial resultando numa lesão mecânica nas membranas das células neuronais e da glia, ruptura microvascular, desregulação iônica e sinalização pró-apoptótica.¹ De seguida, é iniciada uma cascata de lesões secundárias que causam danos permanentes adicionais e disfunção neurológica. As lesões secundárias são divididas temporalmente em aguda, subaguda, intermédia e fase crónica. Durante a fase aguda (Figura 4a), a hemorragia e a disrupção da barreira hemato-espinhal expõem a medula a um

rápido influxo de células inflamatórias (como por exemplo, neutrófilos, macrófagos, etc.) e citocinas. A morte celular necrótica liberta trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), iões de potássio e DNA no microambiente circundante, ativando a microglia a libertar citocinas pró-inflamatórias adicionais e recrutar células inflamatórias periféricas.^{10,11} Os fagócitos eliminam os resíduos rapidamente, mas durante o processo, estes geram produtos citotóxicos, como espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) e nitrogénio, que produzem lesões celulares adicionais pela oxidação de proteínas, lípidos e DNA.¹²

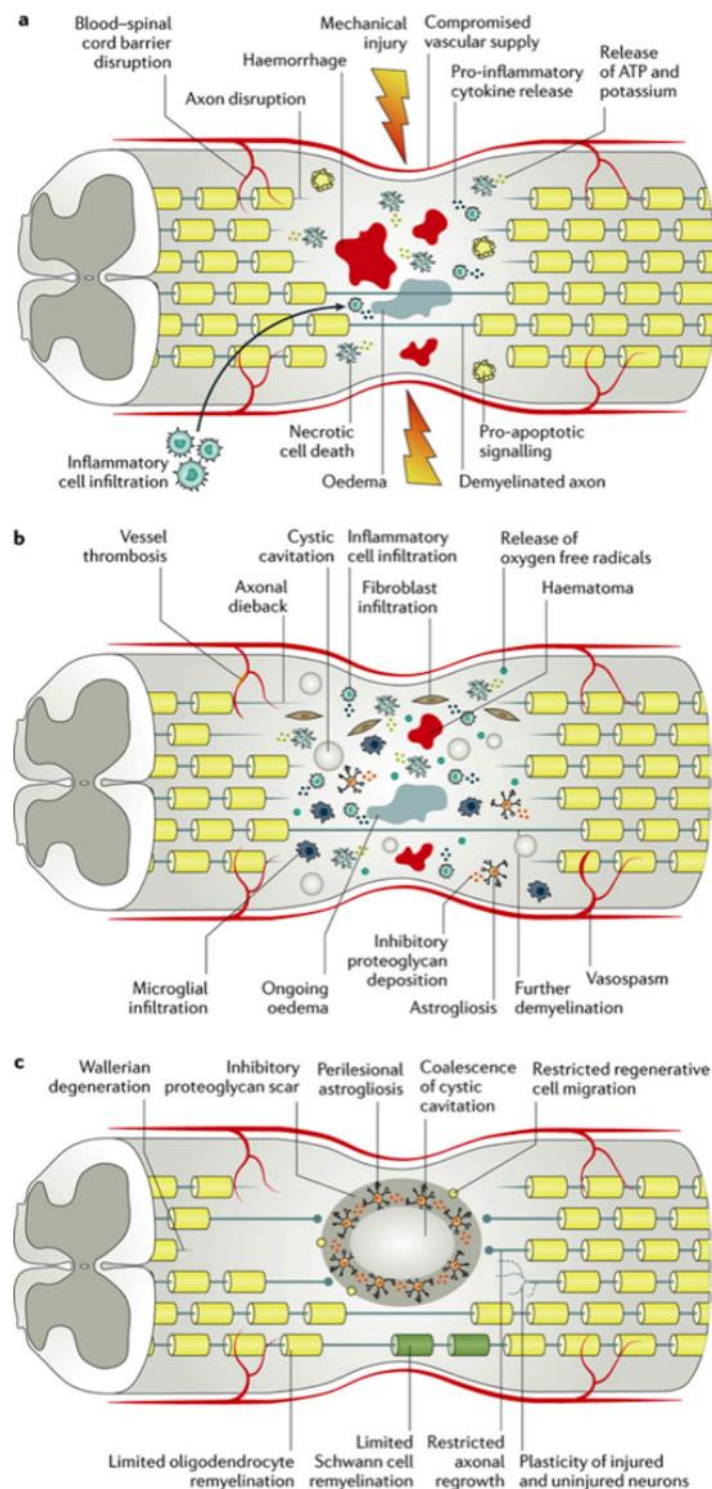


FIGURA 4 – LESÃO TRAUMÁTICA DA MEDULA ESPINHAL: (A) FASE AGUDA (NAS PRIMEIRAS 48 HORAS); (B) FASE SUBAGUDA (ENTRE OS 2 E OS 14 DIAS); E (C) FASE INTERMÉDIA (ENTRE OS 14 DIAS E OS 6 MESES) E CRÓNICA (APÓS OS 6 MESES).¹²

Durante a fase subaguda (Figura 4b), o edema progride, comprometendo o sistema vascular. As infiltrações de células inflamatórias aumentam a área de necrose, gerando microcavidades císticas à medida que as células e a arquitetura extracelular da medula são

danificadas. A morte dos neurónios e a falha na recaptção pelos astrócitos causam acumulação de glutamato no compartimento extracelular e excitotoxicidade dos neurónios próximos. A desregulação do cálcio, inflamação e isquemia contínua, adicionando-se ciclicamente ao microambiente citotóxico.¹²

As fases intermédia e crónica da LTME (Figura 4c) são caracterizadas pela dinâmica remodelação vascular, alterações na composição da matriz extracelular e reorganização dos circuitos neuronais locais e distais. A perda substancial do volume celular leva à criação de vácuo que por sua vez gera a formação de microcavitações císticas, que coalescem e se tornam uma barreira significativa à regeneração, migração celular e crescimento de axónios.¹³ Na região perilesional, os astrócitos proliferam e entrelaçam as suas ramificações na tentativa de conter a zona lesionada, tornando-se um potente inibidor da regeneração¹³. Astrócitos, pericitos e endotélio geram depósitos densos de proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG do inglês *chondroitin sulfate proteoglycans*) como parte da cicatriz fibrosa, que se ligam a recetores leucocitários relacionados ao antígeno comum, como a proteína tirosina fosfatase (PTP do inglês *protein tyrosine phosphatase*).¹² Isto ativa a GTPase RhoA e Rho associado à proteína quinase (ROCK), levando ao cone de crescimento axonal, colapso e falha regenerativa.¹²

De uma perspetiva sistémica, as lesões cervicais e torácicas altas podem produzir insuficiência respiratória e perda da inervação simpática cardiovascular, levando à hipotensão profunda.^{14,15} Isto pode agravar ainda mais a isquemia à medula. Além disso, a perda de inervação simpática aos órgãos linfáticos pode induzir uma imunodeficiência secundária, denominada paralisia imunológica, que aumenta a suscetibilidade dos pacientes a infeções.¹²

2.3 Intervenções terapêuticas na lesão traumática da medula espinhal

Existem várias abordagens para o tratamento da LTME, sendo a principal a cirúrgica que consiste numa cirurgia para remoção de destroços e fluidos que poderiam agravar a pressão mecânica no local do trauma e assim aumentar a inflamação na medula, desta forma previne ou reduz as reações em cascata, diminuindo o volume da lesão.¹⁶ Outra abordagem é o uso da metilprednisolona, um fármaco com propriedades anti-inflamatórias que irá reduzir a ativação de macrófagos no local, e assim promover a redução da inflamação e aumentar a sobrevivência neuronal.³⁰ Outros fármacos também já alcançaram os estudos clínicos, como é o caso da minociclina, um antibiótico que reduz a apoptose dos oligodendrócitos e da microglia, aumentando a regeneração neuronal.³¹ Todos estes métodos de tratamento visam a diminuição

do agravamento da lesão e uma melhoria na recuperação. No entanto, a regeneração completa da medula espinhal apenas é visionada pela engenharia de tecidos, com um desenvolvimento crescente de artigos publicados, desde o início dos anos 2000. Esta abordagem visa a regeneração total de qualquer tecido através do uso de *scaffolds*, associadas ou não a células estaminais, matrizes extracelulares (MECs) sintéticas ou extraídas de outros organismos, hidrogéis funcionais com capacidade de libertar fatores de crescimento, ou agentes de diferenciação, entre outras estratégias.⁷ Sendo esta a terapia com mais potencial, esta será descrita nos capítulos seguintes.

2.4 Engenharia de tecidos

Desde o seu surgimento em meados da década de 1980, a engenharia de tecidos continuou a evoluir num campo multidisciplinar com o objetivo de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, substituir ou regenerar órgãos e/ou tecidos defeituosos.⁸

A engenharia de tecidos apresenta 3 componentes gerais: células reparadoras que podem formar uma MEC funcional; um *scaffold* apropriado para transplante e suporte; e moléculas biorreativas, tais como citocinas e fatores de crescimento que irão apoiar e orientar a formação do tecido desejado. Esses três componentes podem ser usados individualmente ou em combinação para regenerar órgãos ou tecidos.

2.4.1 Propriedades dos *scaffolds*

Intuitivamente, o melhor *scaffold* para um tecido de engenharia deveria ser a MEC do próprio tecido-alvo. Sendo este um sistema bastante complexo, o conceito contemporâneo de *scaffold* na engenharia de tecidos passa por imitar parcialmente as funções da MEC nativa. Assim, o *scaffold* ideal deveria apresentar funções homólogas às da MEC, sendo estas:

→ A arquitetura: os *scaffolds* devem conter na sua estrutura espaço vazio para a neovascularização, formação e remodelação de novos tecidos, de modo a facilitar a integração no tecido hospedeiro após a sua implantação. Os biomateriais devem ser processados para dar uma estrutura porosa suficiente para o transporte eficiente de nutrientes e metabolitos sem comprometer significativamente a estabilidade mecânica do *scaffold*. Além disso, os biomateriais também devem ser degradáveis após a sua implantação a um ritmo temporal compatível com a produção da nova matriz pelo tecido em desenvolvimento.³⁶

→ A compatibilidade cito e tecidual: os *scaffolds* devem fornecer suporte para células externas ou endógenas se fixarem, crescerem e diferenciarem durante a cultura *in vitro* e implantação *in vivo*. Os biomateriais usados para produzir os *scaffolds* precisam de ser compatíveis com os componentes celulares dos tecidos projetados e com as células endógenas no tecido do hospedeiro.⁹

→ A bioatividade: os *scaffolds* podem interagir ativamente com os componentes celulares dos tecidos projetados para facilitar e regular as suas atividades. Os biomateriais podem incluir indutores biológicos, como ligantes de células, para aumentar a fixação, ou pistas físicas, como topografia, para influenciar a morfologia e o alinhamento celular. O *scaffold* também pode servir como um veículo de entrega ou reservatório para sinais estimulantes de crescimento exógeno, como fatores de crescimento para acelerar a regeneração. A este respeito, os biomateriais precisam ser compatíveis com as biomoléculas e passíveis de uma técnica de encapsulamento para uma libertação controlada das biomoléculas com bioatividade retida.¹⁹ Por exemplo, os hidrogéis sintetizados por *cross-linking* covalente ou iônico podem armazenar proteínas e libertá-las através de um mecanismo controlado denominada LCST (do inglês, *lower critical solution temperature*) por avolumamento do hidrogel libertando o conteúdo no seu interior.³⁶

→ As propriedades mecânicas: os *scaffolds* devem fornecer estabilidade mecânica e definir a forma desejada do tecido. As propriedades mecânicas intrínsecas dos biomateriais usados para *scaffolds* ou as suas propriedades de pós-processamento devem corresponder às do tecido hospedeiro.⁷

→ A atividade físico-química: esta característica é opcional, e corresponde aos materiais que sofrem deformação sob ação de um estímulo específico ou que fornecem um estímulo específico sob força mecânica e/ou deformação. Os estímulos podem ser pH, luz, temperatura, corrente elétrica, entre outros.²⁰

Existem quatro categorias principais de *scaffolds* para a engenharia de tecidos (Figura 5), que estão apresentados de seguida:

- **Scaffolds porosos para fixação celular:** Esta abordagem tem à sua disposição uma escolha mais diversificada de biomateriais, desde os naturais aos sintéticos. Permite também a incorporação de desenhos precisos na arquitetura e microestrutura do *scaffold*. Isto é especialmente vantajoso para fazer tecidos de suporte de carga onde as propriedades mecânicas são importantes.³⁵ No entanto, esta abordagem também apresenta certas desvantagens. Em particular, esta técnica é demorada e ineficiente na capacidade de penetração das células no

scaffold. Isto geralmente leva a uma distribuição heterogênea das células nas estruturas dos tecidos alvo. Como resultado, é necessário adicionar outros processos, como agitação, perfusão e tamanho de poro ampliado no sentido de aumentar a eficiência da deposição e fixação celular. Este método apresenta uma baixa viabilidade celular e custo elevado.⁷

- **MEC sem células, proveniente de tecidos alogénicos/xenogénicos:** Esta abordagem remove os antígenos celulares alogénicos ou xenogénicos dos tecidos, de forma a evitar respostas imunológicas após a implantação, mas preservando os componentes da MEC, que são conservados entre as espécies e, portanto, bem tolerados imunologicamente.²¹ As células são extraídas através de métodos físicos, químicos e enzimáticos. De uma forma simples, as membranas celulares são lisadas por tratamentos físicos, como ciclos de congelamento-descongelamento ou soluções iônicas, como soluções hipotônicas ou hipertônicas, antes de separar os componentes celulares da MEC por métodos enzimáticos, como tratamento com tripsina e/ou EDTA. Os componentes citoplasmáticos e celulares nucleares serão então solubilizados e removidos por detergentes. A principal vantagem desta abordagem são as propriedades mecânicas e biológicas mais próximas da natureza. Além disso, além da excelente biocompatibilidade da MEC natural, os fatores de crescimento preservados na matriz sem células podem facilitar ainda mais o crescimento e remodelamento celular. No entanto, a disseminação de células em MEC sintética também pode levar a uma distribuição heterogênea, e uma remoção ineficiente de componentes celulares pode também desencadear reações imunes após a implantação.⁷

- **Folhas de células com MEC auto-secretada:** A engenharia de folha celular apresenta uma abordagem em que as células secretam a sua própria MEC na confluência e são colhidas sem o uso de métodos enzimáticos. Isto é feito através da cultura de células num polímero termo-responsivo, como por exemplo uma placa de cultura revestida com poli(N-isopropilacrilamida) até a confluência. A folha de células confluentes é destacada por regulação térmica da hidrofobicidade dos revestimentos de polímero sem tratamento enzimático. A formação de folhas celulares requer que as células cresçam numa confluência de alta densidade, de modo a que as células possam formar junções estreitas umas com as outras e secretar MEC por si só. Outra vantagem da abordagem de engenharia de folha de células é que as camadas laminadas estão mais propícias a uma rápida neovascularização, ao contrário do transplante de construções grossas com estruturas semeadas de células. Este é um processo de fácil colheita, tem a possibilidade de transplante sem sutura e até mesmo distribuição de células na folha sem

problema de transferência de massa.²² No entanto, uma desvantagem desta abordagem é que é difícil construir tecidos espessos, pois cada camada tem cerca de 30 μm de espessura. São necessárias, por exemplo 10 camadas para formar um implante miocárdio de 300 μm de espessura. Isso é menos viável clinicamente, pois múltiplas cirurgias em pacientes são improváveis e, portanto, é necessária a preparação de adesivos pré-formados. A outra limitação da abordagem desta engenharia é que a construção de tecidos ricos em MEC e tecido hipocelular, como ossos, cartilagem e disco intervertebral, é irrealizável, pois a quantidade de MEC secretada na confluência celular é severamente limitada.⁷

- **Encapsulamento de células em matriz de hidrogel:** O encapsulamento é um processo que encarcera células vivas dentro dos limites de uma membrana semipermeável ou dentro de uma massa sólida homogênea. Os biomateriais usados para o encapsulamento são geralmente hidrogéis, que são formados por *cross-linking* covalente ou iônico de polímeros solúveis em água. O uso predominante deste material é para imunoisolamento durante o transplante de células alogênicas ou xenogênicas. Para que o imunoisolamento funcione, os hidrogéis que encapsulam as células precisam ser processados para se tornarem impenetráveis às células, impermeáveis a grandes moléculas como anticorpos e antígenos celulares, mas permeáveis a nutrientes como oxigênio e glicose, metabolitos como dióxido de carbono e ácido lático, biomoléculas terapêuticas segregadas das células encapsuladas, como a insulina.⁷

Uma característica importante do encapsulamento é que os biomateriais usados sejam capazes de se auto-montar de monômeros líquidos à malha de polímero sólido após a iniciação da reação, que geralmente é pH, temperatura, força iônica ou luz controlada.¹⁰ Esta característica exclusiva combina a fabricação de *scaffold* e a fixação celular num procedimento de uma etapa, pois as células podem ser misturadas com os biomateriais líquidos antes do início da polimerização. As vantagens desta abordagem são o simples procedimento de apenas uma etapa, distribuição celular homogênea no hidrogel e excelente viabilidade celular.²⁴ Além disso, esta abordagem de auto-montagem permite a aplicação injetável em que a polimerização pode ser iniciada após a injeção, levando à fixação do hidrogel após este ser injetado nos tecidos danificados. Isso representa uma abordagem minimamente invasiva da engenharia de tecidos e é vantajosa quando o tecido tem formato irregular. Devido à característica injetável do *scaffold*, esta abordagem é algumas vezes referida como *scaffold* injetável ou engenharia de tecido *in situ*. No entanto, os materiais de hidrogel nesta abordagem geralmente têm propriedades mecânicas empobrecidas. Como resultado, esta abordagem de *scaffold* raramente é usada para tecidos com funções de suporte de carga.⁷

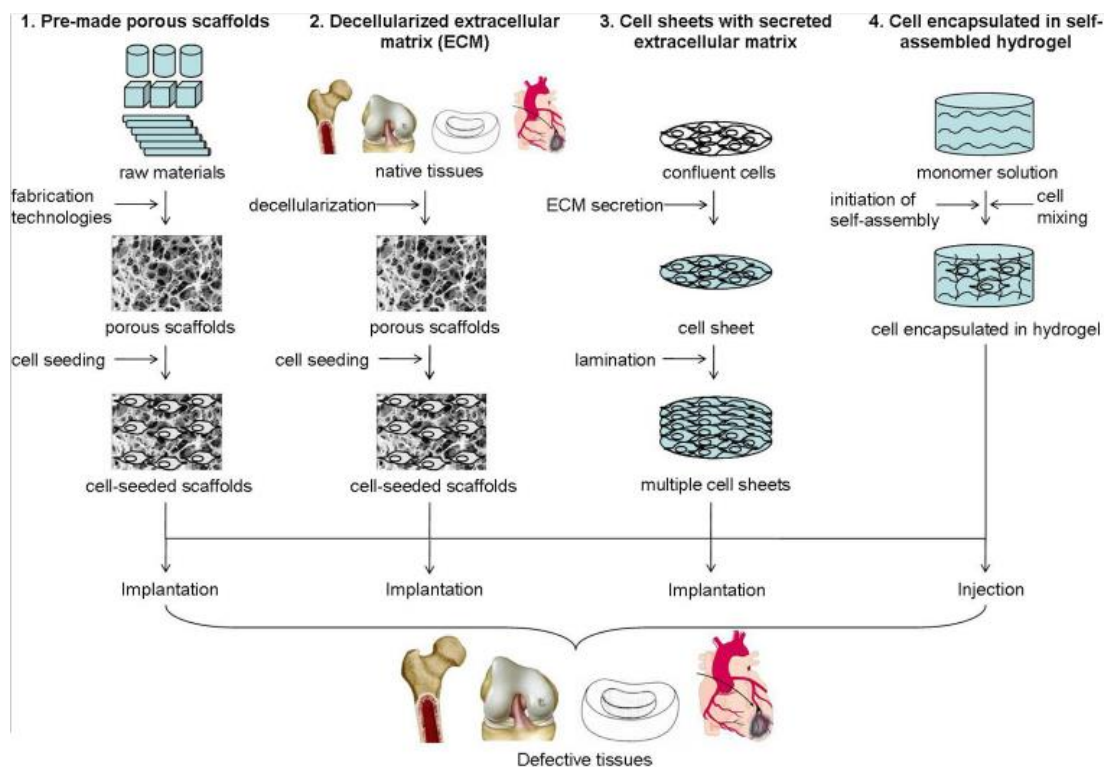


FIGURA 5 – ESQUEMA DOS PRINCIPAIS TIPOS DE SCAFFOLDS USADOS EM ENGENHARIA DE TECIDOS⁷

2.4.2 Hidrogéis

Os hidrogéis são o estado intermediário da matéria entre os estados sólido e líquido. Este contém estrutura de rede de percolação fibrilar tridimensional e uma grande quantidade de solvente presa no seu interior. Mecanicamente, tem um comportamento de um sólido e é viscoelástico por natureza.²⁵

Alguns exemplos de hidrogéis são:

- **Hidrogel de polímeros em cross-linking:** Os hidrogéis de polímeros em *cross-linking* podem ser químicos, formados por ligações covalentes; podem também ser físicos, formados por interações não covalentes; e podem ser hidrogéis de polímero de rede dupla híbrida, onde os géis híbridos são formados por processos químicos e físicos entre os componentes. Todos esses tipos de géis têm diferentes aplicações, tanto do ponto de vista biomédico quanto tecnológico, como memória de forma, impressão 3D, regeneração própria, entre outros.²⁶

- **Hidrogel de polímeros condutores:** Os hidrogéis condutores são géis condutores iónicos e eletrónicos. Nos últimos anos, tem tido aplicações como coletores de energia a partir de

diferentes estímulos, sensores artificiais de pressão, fotovoltaicos, bem como baterias de lítio e robótica.²⁶

- **Hidrogel de polímeros naturais:** Os hidrogéis de polímeros naturais, são reconhecidos pelo seu comportamento de gelificação de vários polímeros de carboidratos, como é o exemplo da celulose e do quitosano. Na presença de diferentes solventes, iões, nanopartículas, estendem as suas aplicações na libertação direcionada de fármacos, engenharia de tecidos, regeneração de cartilagem e adesão celular, entre outros.²⁶

2.5 Biomateriais eletroativos e biorreatores

Biomateriais eletroativos, podem ser polímeros, hidrogéis ou scaffolds com capacidade de conduzir um impulso elétrico. Estes materiais eletroativos podem ser projetados para responder racionalmente sob um estímulo elétrico, disparando excelentes propriedades adequadas para aplicações biomédicas.²⁵ Estes podem ser usados para estimular células no contexto da engenharia de tecidos, fornecendo corrente elétrica;^{27,28,29} mimetizar músculos convertendo energia elétrica em energia mecânica por meio de uma resposta eletromecânica;³⁰ administrar fármacos alterando a sua configuração interna sob um estímulo elétrico;⁵⁹ e apresentar comportamento antimicrobiano devido à condução de eletricidade, impedido a formação de biofilmes.³¹

Os biorreatores são dispositivos que tem um controlo rigoroso sobre o ambiente em processos biológicos ou bioquímicos e uma monitorização controlada. Estes têm sido usados na fermentação, tratamento de águas, processamento de alimentos e produção de fármacos, mas a partir de 1980 começaram também a ser usados com células animais, para produção de vacinas, o que levou à progressão de culturas mais complexas. Os biorreatores regulam através de estímulos físicos ou bioquímicos *in vitro* a diferenciação direcionada, a produção de MEC, para um desenvolvimento celular robusto antes da implantação do *scaffold*.²⁹

2.5.1 Polímeros eletroativos

Piezoelectricidade é uma palavra originária do grego *piezen* que significa pressão. Este efeito piezoelétrico foi primeiramente documentado pelos irmãos Curie em 1880. É espetável que cerca de 30% dos materiais disponíveis no mundo possuam piezoelectricidade.¹

Polímeros eletroativos são que exibem mudança no tamanho ou forma quando estimulados por um campo elétrico. Uma propriedade característica típica destes polímeros é que estes podem sofrer uma deformação substancial enquanto sustentam grandes forças.^{33,34}

Estes podem ser divididos em polímeros eletroativos dielétricos e polímeros eletroativos iônicos. Os polímeros eletroativos iônicos funcionam através da movimentação dos iões no interior do polímero que, em alguns casos pode igualmente levar associada uma modificação mecânica do material (variação da rigidez ou deformação do material). Alguns exemplos são o fluido eletrorreológico¹⁶, polímero metal iônico¹⁷ e gel responsivo a estímulos.³⁶

Os polímeros eletroativos dielétricos funcionam através das forças eletrostáticas entre dois elétrodos que comprimem o polímero, gerando assim alteração da sua forma, esta engenharia permite que o polímero se comprima em espessura e expanda em área aquando sob ação de um campo elétrico. Alguns exemplos deste tipo de engenharia são os polímeros ferroelétricos¹³, polímeros de enxerto eletrostrictivo³⁸, polímeros cristalinos líquidos³⁹ e polímeros piezoelétricos.

Os polímeros piezoelétricos estão a ganhar uma grande importância devido ao seu enorme potencial de aplicação na área biomédica, geração e armazenamento de energia, monitorização e controlo, entre outras.

De todos os polímeros piezoelétricos aquele que tem atraído mais atenção da comunidade científica, tecnológica e industrial é o PVDF devido às suas boas propriedades mecânicas, baixo preço, resistência a solventes, ácidos, calor e radiação. No entanto, as suas características diferenciadoras mais relevantes, comparativamente com outros polímeros são a sua elevada resposta dielétrica, piezoelétrica, piroelétrica (criação de um potencial elétrico quando submetido a uma variação de temperatura) e ferroelétrica (polarização espontânea que pode ser invertida com a aplicação de um campo elétrico externo) o que lhe confere um elevado interesse científico e tecnológico.

Este polímero plástico, existe em 5 diferentes conformações, sendo as 3 seguintes as mais abundantes: alfa, beta e gama. representadas na Figura 6.

As diferentes conformações da cadeia deste polímero estão projetadas em zigue-zague num plano totalmente trans (TTTT) para a fase α , num plano TGTG (trans-gauche-trans-gauche), para a fase β e num plano T₃GT₃G para a fase λ .⁴⁰ Assim cada cadeia, dependendo da fase cristalina em que está orientada, possui um momento dipolar com orientação e intensidade diferente. Aqui a fase β , apresenta um maior momento dipolar por unidade de polímero com o valor igual a 8×10^{-30} Cm (Coulomb-metro).⁴¹

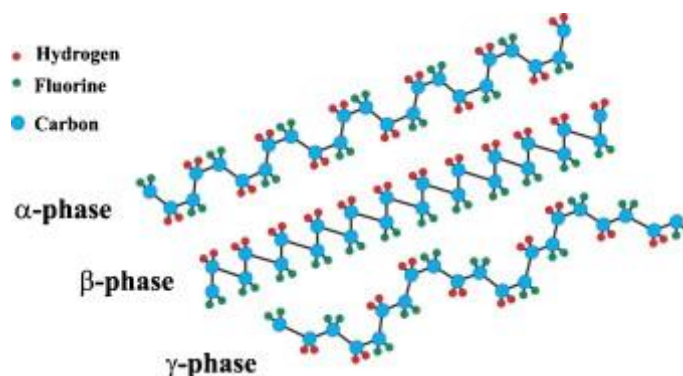


FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONFORMAÇÃO EM CADEIA DAS FASES ALFA, BETA E GAMA DO PVDF.⁴⁰

O PVDF gera um potencial elétrico quando deformado mecanicamente (e vice-versa) assim é importante que o estímulo mecânico seja fornecido de alguma forma. Para evitar o agravamento da lesão e como o paciente com a LTME estará imobilizado, um estímulo de forma indireta será o mais favorável. Desta forma, o estímulo magnético poderá ser a solução.

2.5.2 Compósitos magnetoativos

Um compósito magnetoactivo é um material com inclusão de partículas magnéticas numa matriz (filme, gel ou outro tipo de *scaffold*), que permite, dependendo das características dessas partículas, a ativação através de campos magnéticos, de uma resposta mecânica denominados magnetomecânicos; de variações de dureza/viscosidade denominados magnetoreológicos; de movimentos iônicos denominados magnetoiónicos; de variações de condutividade denominados magnetoresistivos; de variações de temperatura; denominados magnetotérmicos ou da geração de potencial eléctrico denominados magnetoelétricos.⁶⁴ Mas como funciona o magnetismo das nanopartículas?

Quando o domínio das partículas diminui abaixo do diâmetro crítico, a coercividade dessas partículas torna-se zero e essas partículas tornam-se superparamagnéticas. O superparamagnetismo é influenciado por efeitos térmicos, e, por isso, quando nas partículas superparamagnéticas, as flutuações térmicas são fortes o suficiente para desmagnetizar espontaneamente um conjunto previamente saturado, essas partículas perdem a coercividade nula e não têm histerese magnética. As nanopartículas superparamagnéticas magnetizam-se na presença de um ímã/campo magnético externo, mas reverterem para um estado não magnetizado quando o ímã/campo magnético externo é removido. Isso evita um comportamento “ativo” das partículas quando não há campo aplicado. Como os óxidos de ferro (Fe_3O_4) é o mais

magnético de todos os minerais naturais da Terra, sendo por isso amplamente utilizado na forma de nanopartículas superparamagnéticas para todos os tipos de aplicações biológicas.⁴⁴

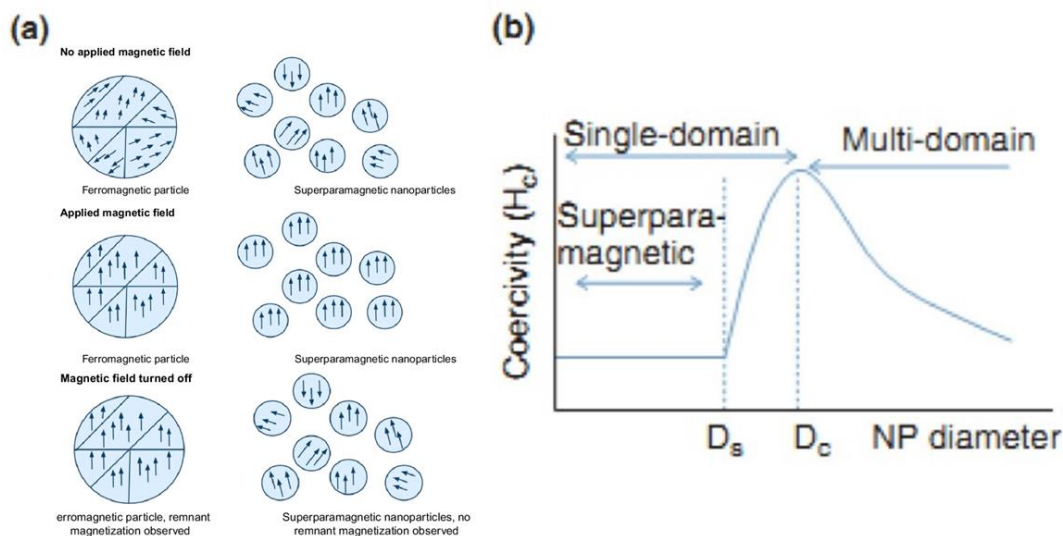


FIGURA 7 – COMPORTAMENTO DAS NANOPARTÍCULAS DE FERRO E SUPERPARAMAGNÉTICAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE CAMPO EXTERNO A) REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA COERCIVIDADE EM RELAÇÃO AO TAMANHO DA NANOPARTÍCULA⁴⁴

Como se pode observar na figura 7a), na ausência de um campo magnético externo, os domínios de uma nanopartícula ferromagnética e superparamagnética encontram-se desalinhados. Quando o campo é aplicado o momento magnético das nanopartículas superparamagnéticas e ferromagnéticas de domínio único alinham-se com o campo aplicado. Quando voltamos a remover o campo magnético, as nanopartículas ferromagnéticas mantêm uma magnetização líquida, enquanto que as nanopartículas superparamagnéticas não exibem magnetização líquida devido à rápida reversão do momento magnético. Na figura 7b) também é possível observar a relação entre o tamanho das nanopartículas e as estruturas do domínio magnético. D_s e D_c representam os limites do superparamagnetismo e de tamanho crítico, respetivamente, ou seja, a partir do qual a partícula deixa de ter um único domínio e o tamanho em que passa a conter múltiplos domínios que se mantêm uns aos outros na ausência de campo externo.

2.6 Estratégias de engenharia de tecidos para regeneração de medula espinhal: Estado de arte.

Os implantes de biomateriais têm como função reparar ou substituir a estrutura anatômica de tecidos ausentes ou danificados por meio das características morfológicas dos biomateriais contendo moléculas biológicas.

Alguns exemplos de polímeros piezoelétricos biodegradáveis são polímeros de origem natural como o colágeno, celulose, quitina, quitosano, fibrina e amilose. No entanto, o coeficiente piezoelétrico destes polímeros atinge no seu limite 2 pC/N. Para aumentar este estímulo, polímeros sintéticos são também uma opção, como por exemplo o PVDF e o Poli(fluoreto de vinilideno-trifluoroetileno) (P(VDF-TrFE)). Estes polímeros eletroativos dielétricos demonstraram resultados promissores sob a forma de fibras *in vitro*⁴⁵ e *in vivo*⁴; assim como aplicação de filmes onde foram estimulados por oscilação⁴⁶ ou por ultra-sons⁴⁷ *in vitro*. Estes materiais são pouco citotóxicos e apresentam um coeficiente piezoelétrico de 24 pC/N e 38 pC/N para o PVDF e o P(VDF-TrFE), respectivamente.

O PVDF e os seus co-polímeros estão amplamente estudados, filmes de PVDF revestidos com *Poly-D-Lysine* (PDL), e estimulados com 50 Hz de oscilação, demonstraram um aumento de 116% no número de ramificações de neurites, em células PC12, os números de terminais e processos também aumentaram 84 e 79%, respectivamente.⁴⁶ Fibras de P(VDF-TrFE) revestidas com matrigel demonstraram um maior número de células, neurites mais longas e maior mielinização, em células de Schwann (SCs) e explantes do gânglio da raiz dorsal (DRG).³²

Estudo de micropilares de PVDF não foram encontrados em literatura, pelo que é uma morfologia inovadora nesta área.

Nanopartículas também são conhecidas por aumentar o efeito magnetoelétrico de diferentes polímeros.⁴⁸ Nanopartículas de óxido de ferro demonstraram resultados na destruição de biofilmes em bactérias, estas, conseguem penetrar nos biofilmes, enquanto os antibióticos não, sob um campo magnético para destruir e matar bactérias.⁴⁹ Estas podem ser interiorizadas no interior de polímeros plásticos⁵⁰ ou hidrogéis⁶³ e gerar microambientes eletroativos para células musculares, esqueléticas⁵⁰

A combinação destas partículas com PVDF e P(VDF-TrFE) já foi realizada mas para outras morfologias⁵¹ onde se demonstrou que é possível fornecer estímulos mecanoelétricos às

células, como por exemplo células-tronco mesenquimais⁷⁴ e pré-osteoblastos⁷⁵ com crescimentos acima dos 25%.

Apesar do progresso no uso de nanopartículas nos últimos dois anos, o verdadeiro potencial das aplicações das nanopartículas na resolução dos problemas atuais em engenharia de tecidos ainda não foi realizado.⁴⁸

O objetivo de um *scaffold* é unir a medula espinhal danificada para que os pacientes possam recuperar a função motora e sensorial. Existem já vários estudos de matrizes poliméricas direcionadas para este sentido, nomeadamente:

- **QL6:** QL6 é um material natural, peptídico e biodegradável com pH neutro, que é solúvel em água e se auto-monta numa conformação semelhante a uma rede em escala nanométrica *in vivo*, ou seja, é um material *in situ*. QL6 demonstra um efeito neuroprotetor na LTME e pode ser administrado antes ou com células-tronco neuronais para aumentar a sobrevivência do enxerto, reduzir a inflamação e a cicatriz glial e melhorar a função motora em modelos de pequenos animais.¹

- **Hialuronano/metilcelulose:** Hialuronano/metilcelulose (HAMC) é um polímero injetável e biodegradável que é capaz de suportar o enxerto de células tronco neuronais e oligodendrócitos na LTME para aumentar a recuperação funcional. O polímero também pode ser modificado para fornecer fatores de crescimento (por exemplo, PDGF-AA (fator de crescimento derivado de plaquetas), pequenos péptidos ligantes (por exemplo, RGD, conhecido por aumentar a adesão celular²¹) e fármacos degradantes da cicatriz glial (por exemplo, condroitinase ABC, que irá catalisar as ligações de proteoglicanos de sulfato de condroitina CSPGs que são sobre expressas pelas células da glia.²²

Existem também estratégias de engenharia de tecidos já em estudo clínico, nomeadamente:

- **INSPIRE—Neuro-Spinal Scaffold:** O polímero é composto por poli(ácido láctico-glicólico) covalentemente conjugado com poli-L-lisina e é projetado para favorecer interações célula-material. Foi demonstrado que o *scaffold* do polímero com células-tronco neuronais melhora a recuperação funcional em modelos de hemissecção de animais.²⁴

Um estudo clínico de fase II avaliou a segurança e a viabilidade da implantação deste *scaffold* dentro das primeiras 96 horas após a lesão, ou seja, na fase aguda e subaguda. Foram denotadas melhorias significativas na função motora e sensorial, bem como desaparecimento da dor neuropática.²³

- **NeuroRegen scaffold de apo-colagénio de bovino:** Um *scaffold* natural xenogénico, preparado através da aponeurose de bovino para formar filamentos, folhas ou tubos para crescimento neuronal, com boa biocompatibilidade e direcionamento de crescimento dos axónios.³

Este *scaffold* foi implantado com células-tronco mesenquimais (MSC do inglês *mesenchymal stem cells*) num estudo clínico de fase II com 8 pacientes na fase crónica da LTME, ou seja, com mais de 6 meses após a lesão. 1 ano após a implantação do *scaffold*, foi verificada uma expansão da área sensorial e motora, nomeadamente atividade dos dedos, aumento da estabilidade do tronco, sensação de defecação e recuperação da função neural autónoma.²⁰

Através desta análise bibliográfica, verificou-se que existem estudos que confirmam a adequabilidade dos estímulos provenientes de materiais eletroativos na modulação do comportamento de células. No entanto, não foram encontradas informações relativas à aplicação de estímulos MEs através de micropilares. Por isso, o principal foco desta dissertação é o desenvolvimento de uma plataforma ativa com estímulos gerados pelos micropilares e verificar se estes podem auxiliar a regeneração saudável de neurónios.

Capítulo III: Materiais e Métodos

3.1 Produção dos pilares

3.1.1 Impressão 3D dos moldes dos *scaffolds*

Foram desenvolvidos três modelos 3D para os moldes do *scaffold* com o uso do software Autodesk Fusion 360, Prusa Slicer 2.4.1. Os parâmetros do ficheiro G-code para as grelhas, incluíam uma altura de 1,5 mm, com uma densidade de preenchimento de 20%. Os micropilares foram contruídos com um filamento de Polivinil álcool (PVA, Verbatim) na Original Prusa i3 MK3S+ 3D *printer* com um bocal de 0.25 mm para as grelhas e de 0.4 mm para as restantes peças. Foi construída também uma caixa de reforço de poli-ácido láctico (PLA do inglês *Polylactic Acid*) para dar resistência à estrutura dos moldes. As peças construídas, dispostas na Figura 6, foram montadas manualmente no molde final.

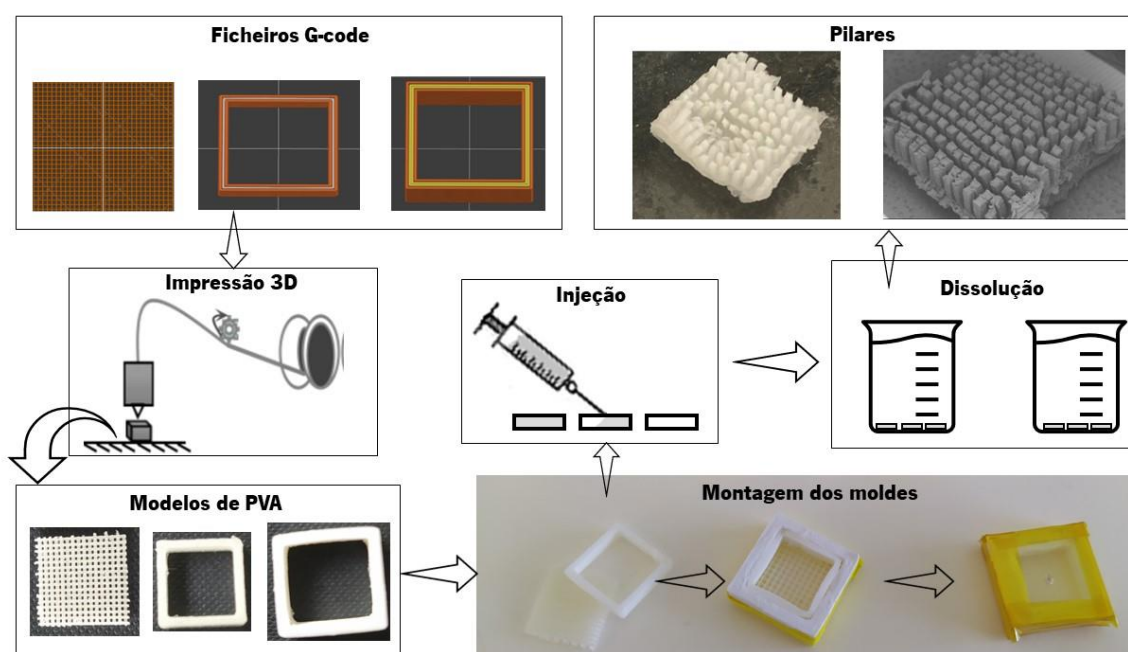


FIGURA 8 – ESQUEMA DE SÍNTESE DOS PILARES DE PVDF

3.1.2 Síntese dos pilares eletroativos com e sem Fe_3O_4

Micropilares de controlo:

Para a escolha do melhor polímero foram feitas três tentativas: a primeira com PLLA (Merck) numa concentração de 10% em Diclorometano (DCM, Fisher Chemical), fabricado da seguinte forma:

Foi dissolvido PLLA (Merck) numa concentração de 10% em DCM. sob agitação magnética (200 rpm) durante 3 horas. Após a dissolução total do polímero, este foi injetado dentro dos moldes com o auxílio de uma seringa de plástico de 10 mL, com uma agulha de diâmetro interno de 0.16 mm (Nordson, EFD). Após verificar a polimerização do composto, estes foram colocados num gobelé de 1 L com água, durante 48 horas para a dissolução do PVA. Os moldes foram retirados da caixa de reforço com um bisturi e uma pinça, e deixados a secar à temperatura ambiente. (Figura 8).

Na segunda tentativa foram usados os polímeros PLLA (Merck) e Estireno-Etileno-Butileno-Estireno (SEBS do inglês *Styrene-Ethylene-Butylene-Styrene*, CHIYUAN) em frações 1:1, numa concentração de 10% de DCM, com o mesmo procedimento descrito acima;

Para a última tentativa, foi utilizado o PVDF 6010 (Solvay) em dimetilformamida (DMF, Fisher Chemical) sob agitação magnética (200 rpm) durante 3 horas, após o polímero estar dissolvido, seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima.

Micropilares magnéticos: Foram dispersas primeiramente as ferrites ferromagnéticas (Fe_3O_4 , *Nanostructured & Amorphous Materials Inc.*) em DMF numa concentração de 0.01 g/mL, e colocadas num sonicador durante 90 minutos. De seguida, foi adicionado o PVDF com uma concentração de 0.15 g/mL, e a amostra foi agitada mecanicamente durante 7 horas. Após este processo foi realizada a injeção nos moldes, dissolução do PVA e o processo de secagem, como descrito anteriormente para as amostras de PVDF.

3.2 Produção do hidrogel

3.2.1 Oxidação do Alginato de Sódio

Preparou-se 100 mL de uma solução de alginato de sódio (Fisher Chemical) 1% (w/v). A essa solução foram adicionados gota a gota de uma solução de periodato de sódio (Sigma-Aldrich) [0,5M], perfazendo um volume total de 5 mL, sob agitação e ausência de luz. Após 24 horas, foram adicionados 2 mL de etilenoglicol (Sigma-Aldrich) para cessar a reação. Após 2 horas, a solução foi colocada em bolsas de diálise e a água foi substituída várias vezes ao longo de 3 dias. A solução foi por fim colocada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e após uns dias, liofilizada.

3.3 Caracterizações dos materiais

3.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento

O microscópio eletrônico de varrimento (SEM do inglês *scanning electron microscopy*) é constituído por uma fonte de eletrões, lentes eletromagnéticas e um detetor de eletrões secundários. Usa um feixe de eletrões em vez de luz, que é focado na amostra através das lentes eletromagnéticas que irá incidir na amostra. A amostra, por sua vez, emite eletrões secundários que são detetados quantitativamente. O número de eletrões emitidos depende da topografia da amostra, assim com as variações no número de eletrões detetados é possível construir o perfil topográfico⁵⁸ (Figura 9).

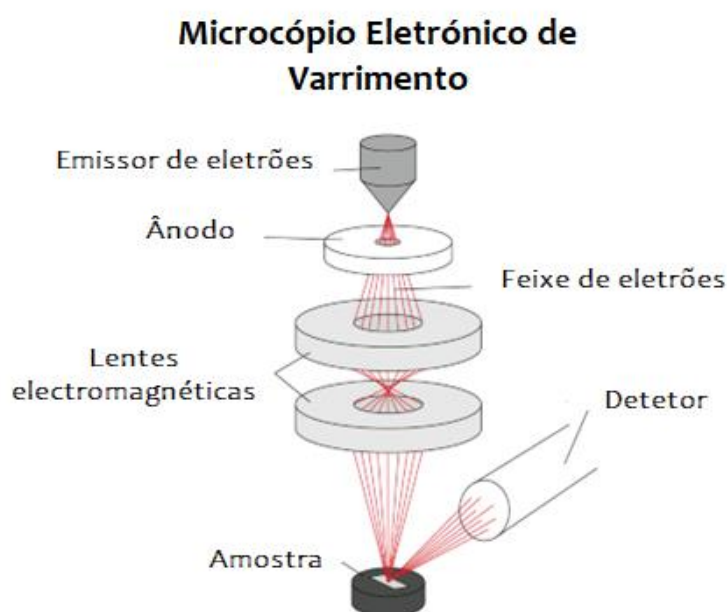


FIGURA 9 - IMAGEM ILUSTRATIVA DA CONSTITUIÇÃO DO MICROSCÓPIO ELETRÓNICO DE VARRIMENTO.²⁰

As amostras foram preparadas com revestimento de ouro com cerca de 20 nm de espessura numa Quorum Emitech K550 Sputter Coater. De seguida, foram visualizadas no equipamento Hitachi S-4800 SEM com uma voltagem de 15 kV nas diferentes ampliações. Procedeu-se depois às medições dos pilares através do programa *ImageJ*.

3.3.2 Goniómetro de ângulo de contato

O Goniómetro mede a hidrofilicidade da amostra. Esta técnica consiste na deposição de uma gota de água ou outro solvente sob a superfície dos pilares. A gota depositada forma uma semiesfera, e o ângulo entre esta semiesfera e a superfície dos pilares (θ) é detetado pela câmara do goniómetro. Se $\theta < 90^\circ$ é considerado um material hidrofílico, se for $\theta > 90^\circ$ é hidrofóbico.

Quatro micropilares de PVDF foram colocados sob a base do goniómetro (OCA 15EC, Neurtek), o desenvolvimento da gota com 10 μL de água desionizada foi registado ao longo de 5-10 segundos e depois capturada a imagem com o *Ossila Contact Angle* software.

3.3.3 Teste de Absorção

O propósito final dos pilares é a cultura celular, por isso é importante perceber se existem alterações significativas nas suas dimensões após a submersão. Para isso foi realizado um teste de absorção (Figura 10).

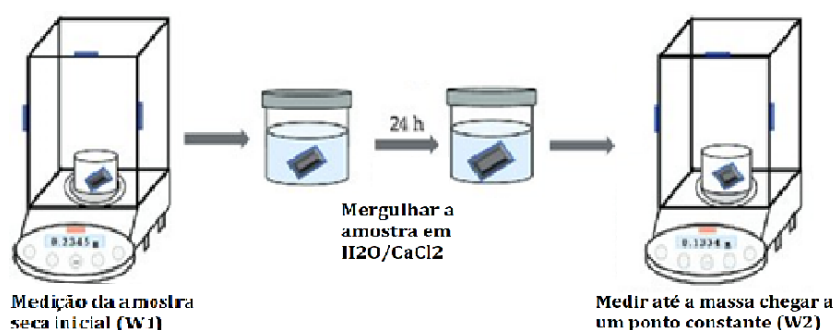


FIGURA 10 - IMAGEM ILUSTRATIVA DO PROCESSO DO TESTE DE ABSORÇÃO.⁷²

Para calcular a capacidade de absorção em água, os *scaffolds* fabricados foram pesados (W_1) e mergulhados em água à temperatura ambiente durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram recuperadas e a água adicional foi removida usando papel. Os *scaffolds* húmidos foram novamente pesados (W_2), como representado na figura 5. A capacidade de absorção de água foi calculada usando a equação 1:

$$W_t = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \times 100 \quad (1)$$

onde W_t representa a percentagem de absorção, W_1 representa o peso das amostras secas, W_2 o peso das amostras húmidas.

3.3.4 Espectroscopia de infravermelhos transformada de Fourier – Reflexão total atenuada

A reflexão total atenuada é uma técnica usada em conjunto com a espectroscopia de infravermelho que permite que as amostras sejam examinadas diretamente no estado sólido ou líquido sem preparação adicional. Esta técnica consiste num feixe Infravermelho (IV) direcionado para um cristal opticamente denso com um alto índice de refração num determinado ângulo. Essa reflexão interna cria uma onda evanescente que se estende além da superfície do cristal até a amostra mantida em contato com o cristal (Figura 11).

Nas regiões do espectro onde a amostra absorve energia, a onda evanescente é atenuada. O feixe atenuado retorna ao cristal, sai pela extremidade oposta do cristal e é direcionado para um detector de IV. O detector registra o feixe IV atenuado e o software gera um espectro IV.

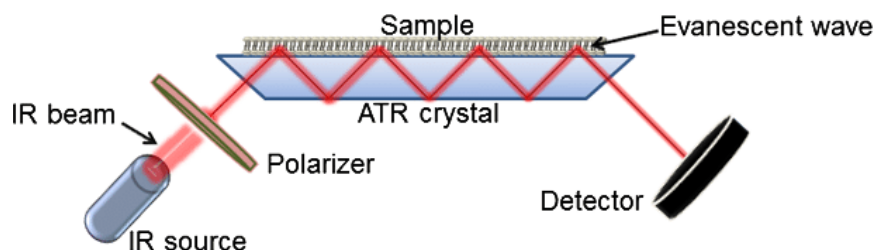


FIGURA 11 - ILUSTRAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO FTIR-ATR.³⁴

Esta técnica permite que os componentes moleculares e as estruturas de um material sejam determinados medindo a transmitância da radiação IV por uma amostra de material. Permite também distinguir as diversas formas cristalinas do PVDF.³⁵

Os espectros obtidos de FTIR-ATR, foram determinados por um espectrofotômetro FTIR-ATR JASCO FT/IR-6100. O espectro foi medido no intervalo entre 4000–400 cm^{-1} com 64 scans com uma resolução de 4 cm^{-1} .

Os valores de transmitância retirados do gráfico, são convertidos para absorvância através da equação 2.

$$A = 2 - \log_{10}(\%T) \quad (2)$$

Numa amostra contendo apenas as fases α e β é usada a equação 3 para calcular a fração relativa de Fase β .³⁷

$$F_{\beta} = \frac{A_{\beta}}{(K_{\beta}/K_{\alpha})A_{\alpha} + A_{\beta}} \quad (3)$$

onde F_{β} representa a fração de fase β , A_{α} e A_{β} a absorção a 763 e 840 cm^{-1} , K_{α} e K_{β} os coeficientes de absorção naqueles números de onda, cujos valores são $6,1 \times 10^4$ e $7,7 \times 10^4$ cm^2/mol , respectivamente. ^[34,37]

3.3.5 Calorimetria diferencial de varrimento

O DSC é uma técnica de análise térmica que permite medir o fluxo de calor associado às transições de um material em função da sua temperatura. O princípio desta técnica é baseado na transformação física da amostra, neste caso a transição de fase. Existe uma taxa de calor crescente e constante, que está associada a uma determinada energia despendida à amostra de referência e a amostra em análise, em que cada fluxo é detetado separadamente. Durante a transição sólido $\rightarrow$ líquido a amostra não altera a sua temperatura, e, portanto, é necessário um fluxo de calor maior para aumentar sua temperatura na mesma taxa que a referência. Através da detecção dos fluxos de calor da referência e da amostra é possível determinar diferenças de fase na amostra e retirar a integral normalizada do desvio de fluxo de calor, denominada entalpia de fusão da amostra.

Para analisar os *scaffolds* por calorimetria diferencial de varrimento (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) foi usado o Mettler Toledo DSC822e. Para isso, os pilares foram cortados em tamanhos semelhantes antes de serem colocadas em cadinhos de 50 μL de alumínio selados, com um pequeno furo, para que o gás produzido durante o experimento possa ser expelido. As amostras foram aquecidas de 20 $^{\circ}\text{C}$ até 250 $^{\circ}\text{C}$, a uma taxa de $10 \pm 0,2$ $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e com um fluxo de nitrogénio de 20 mL/min .

Através da integral normalizada (ΔH) é possível aplicar a equação 4 para calcular a percentagem de cristalinidade X_c .

$$X_c = \frac{\Delta H}{x\Delta H_{\alpha} + y\Delta H_{\beta}} \quad (4)$$

Onde ΔH representa a entalpia de fusão da amostra, ΔH_{α} e ΔH_{β} são as entalpias de fusão de PVDF 100% cristalino na fase α e β com os valores $\Delta H_{\alpha} = 93,07$ J/g e $\Delta H_{\beta} = 103,4$ J/g , respectivamente ⁶¹. As letras x e y são a quantidade relativa das fases α e β presentes na amostra, previamente determinadas pela técnica de FTIR.

3.3.6 Magnetômetro de amostra vibratória

O VSM é um dispositivo que permite analisar as propriedades magnéticas de um material, nomeadamente a coercividade, saturação e magnetização. Isto é possível ao segurar a amostra numa haste, suspensa entre dois eletroímãs que aplicam um campo elétrico uniforme (Figura 12). A haste com a amostra oscila verticalmente, originando uma tensão induzida nas bobinas de captação, proporcional ao momento magnético da amostra.

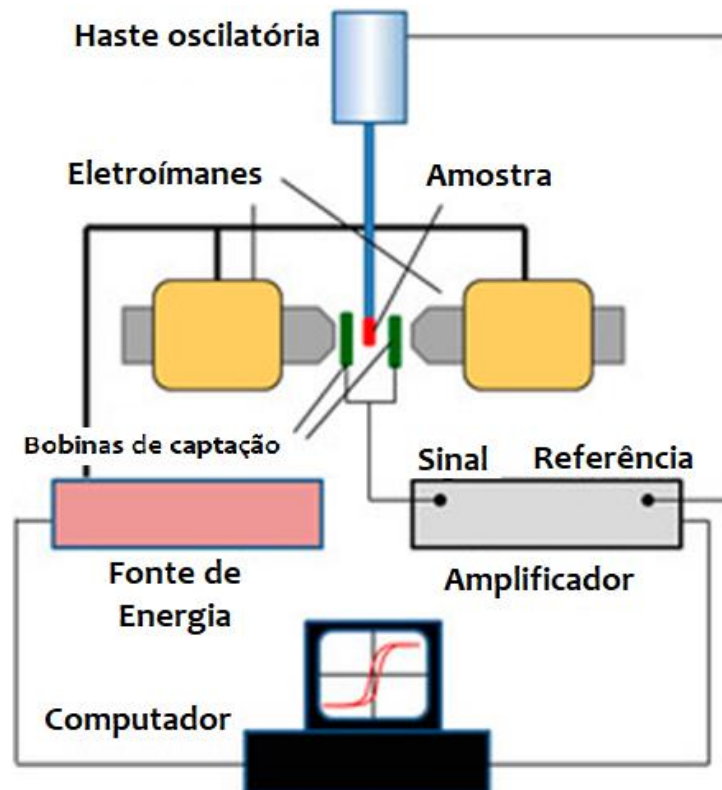


FIGURA 12 - ILUSTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES E FUNCIONAMENTO DO VSM.

Ao variar o campo magnético criado pelo eletroímã, são feitos dois varrimentos, em direções opostas, do positivo para o negativo e de volta para o positivo. Como resultado, uma curva de histerese (no caso nos materiais ferromagnéticos) é obtida e a partir daí as propriedades magnéticas da amostra podem ser deduzidas.

Um magnetômetro de amostra vibrante (Microsense 2.2 Tesla) foi utilizado para estudar as propriedades magnéticas das partículas nos compósitos. Esta análise foi efetuada à temperatura ambiente. O campo magnético aplicado variou de -10.000 a 10.000 Oe.

3.3.7 Análise mecânica dinâmica

O DMA é uma técnica usada para estudar e caracterizar materiais. É usada para estudar o comportamento viscoelástico de polímeros, através da sua resposta quando sujeitos a forças dinâmicas ou cíclicas. Estas respostas são expressas em termos de *storage modulus* G' , *elastic modulus* G'' , e força de amplitude. O *storage modulus* mede o comportamento elástico da amostra, ou seja, a capacidade da amostra absorver energia no seu comportamento elástico. O *elastic modulus* é a dissipação de energia do material e está relacionado com a capacidade do material libertar o stress através de calor.

A análise mecânica dinâmica (DMA/SDTA861e Mettler toledo) foi realizada no modo de cisalhamento. A amostra em forma de quadrado 5x5 mm e 2 mm de altura foi colocada lateralmente entre as pinças com um espaçamento de 2 mm. Os espectros de DMA foram obtidos com uma varredura de cisalhamento ao longo de 2 horas, com um aumento de 10 $\mu\text{m}/\text{min}$ a 1 Hz de frequência e uma força de 1 N. A temperatura manteve-se constante a 37 °C, pois é a temperatura que será usada nas culturas celulares.

3.3.8 Caracterização por Raios-X

O método de caracterização por Raios-X tem a capacidade de determinar o tamanho dos átomos, os comprimentos e os tipos de ligações químicas e as diferenças de escala atômica entre vários materiais. O feixe de raios X tem um comprimento de onda semelhante ao espaçamento entre os átomos na amostra, de modo que o ângulo de difração é afetado pelo espaçamento dos átomos na molécula, permitindo distinguir diferenças químicas, como é o caso do alginato de sódio (SA, do inglês, *Sodium Alginate*) com o alginato de sódio oxidado (OSA, do inglês, *Oxidized Sodium Alginate*).

O perfil do OSA foi traçado por um difractómetro Diffractometer Philips X'Pert, PRO, com radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). As medidas foram conduzidas no modo *step scan* com uma velocidade 0.001 °/s com um 2θ de alcance de 10° a 60°.

3.3.9 Inserção do fator bioquímico RGD no OSA

A uma solução de OSA 10% (w/v) foi adicionada uma solução aquosa de RGD (Figura 13) numa concentração de 10 g/L. A reação decorreu durante 36 horas, sob agitação em obscuridade. Após este período, a solução foi colocada a -80 °C e liofilizada.

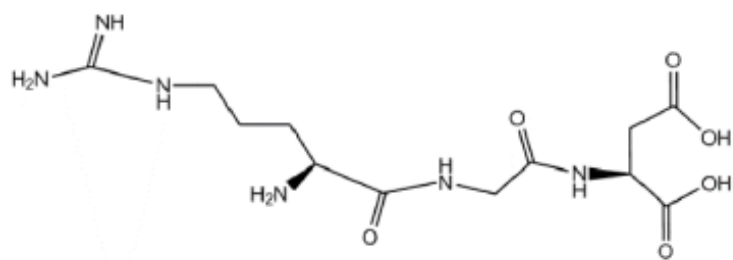


FIGURA 13 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DE RGD (ARGININA-GLICINA-ASPARTATO).¹⁹

3.3.10 Síntese do hidrogel de OSA/SA nos pilares

Uma solução de 2% (w/w) de alginato de sódio oxidado foi misturada com alginato de sódio numa razão de 8:2 em água mili-Q. A solução foi injetada na superfície dos pilares onde foram submergidos com cloreto de cálcio [0.1 M] durante 24 horas. Após a polimerização do hidrogel (Figura 14), o cloreto de cálcio foi substituído por 750 µL de Solução tampão fosfato (PBS do inglês, *Phosphate Buffer Saline*).

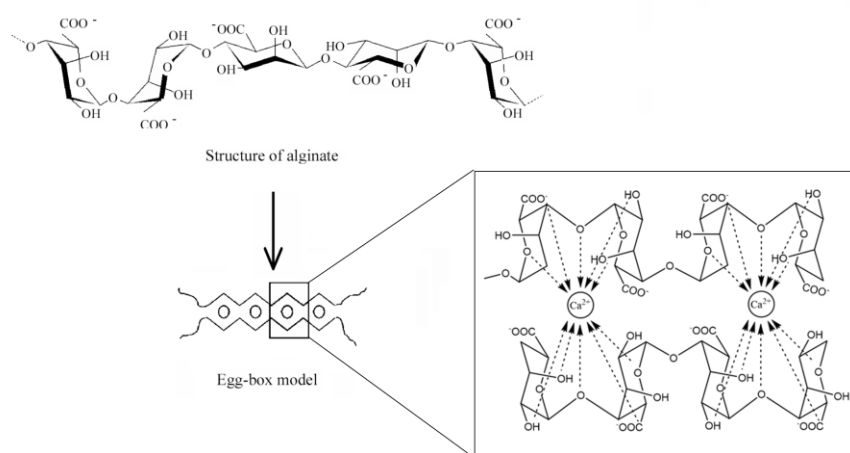


FIGURA 14 - ILUSTRAÇÃO COM A REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL DO ALGINATO E A SUA CONFORMAÇÃO APÓS POLIMERIZADO COM O CLORETO DE CÁLCIO.^{52,53}

3.4 Ensaios celulares

3.4.1 Esterilização das amostras

Inicialmente, os micropilares com as dimensões 4 x 4 mm foram colocados numa placa de petri com etanol durante 30 min. Após este período foram deixadas a secar e esterilizadas

através de radiação Ultravioleta (UVs) durante 3 horas, (1 hora e meia em cada lado). Por fim, as amostras foram sujeitas a 5 lavagens durante 5 minutos, cada com uma solução tampão de fosfato alcalino (PBS, do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*, Biochrom) a 1%.

3.4.2 Cultura celular

As células de neuroblastoma SH-SY5Y foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco/mistura de nutrientes F-12 Ham (DMEM/F-12 (1:1), Pan Biotech) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Biochrom) e 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Biochrom). As células foram semeadas em frascos de cultura de 75 cm² a 37 °C sob ar humidificado a 95% e atmosfera de 5% de CO₂. O meio cultivado foi trocado a cada dois dias e quando as células atingiram cerca de 60-70% de confluência foram separadas com 0,05% de tripsina-EDTA (Biochrom).

3.4.3 Ensaio de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das amostras produzidas foi realizada numa abordagem de contacto indireto, de acordo com os padrões descritos na norma ISO 10993-5.

Para isso, os pilares previamente esterilizados foram colocados numa placa de cultura celular de 24 poços de poliestireno em contacto com DMEM Hans F-12 (1:1) e incubada sob condições de cultura (37 °C e 95% de ar humidificado contendo 5% CO₂) por 24 horas. Ao mesmo tempo, as células SH-SY5Y foram semeadas numa placa de 96 poços de poliestireno com uma densidade de $3,0 \times 10^4$ células/mL e incubadas por 24 horas para permitir a adesão celular. Após 24 horas, o meio de cultura da placa de 96 poços foi removido e substituído por 100 µL por poço de meio extraído da placa que continha os *scaffolds*. De seguida, as células foram incubadas durante 72 horas nas mesmas condições. Após esse período, o número de células viáveis é quantificado pelo método de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT, Sigma Aldrich). Para isso, o meio em contacto com as células é retirado e substituído por uma solução de MTT (5 mg/mL de MTT dissolvido em DMEM na proporção de 1:10) e incubado no escuro a 37 °C por 3 horas. Depois disso, a solução de MTT é removida e o formazano precipitado dissolvido em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por cada poço. A quantificação é feita através da medição da absorvância a 570 nm, retirando a absorvância a 690 nm (absorvância correspondente da placa), usando um leitor de placas espectralométrico (Infinite M Plex, TECAN).

Todos os resultados foram obtidos a partir de 4 réplicas por cada amostra e analisados como a viabilidade média $\pm$ desvio padrão. A percentagem da viabilidade celular foi calculada através da equação 5 em que o controlo positivo representa as células nos poços que continham apenas o meio de cultura.

O controlo positivo representa as células cultivadas apenas com meio e o controlo negativo as células cultivadas com meio e DMSO.

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorv\ancia\ da\ amostra}{Absorv\ancia\ do\ controlo\ positivo} \times 100 \quad (5)$$

3.4.4 Proliferação celular

Uma suspensão celular foi preparada para semear 10×10^4 células/mL no topo de cada amostra. As placas de cultura foram incubadas nas mesmas condições de crescimento mencionadas anteriormente por 24 horas para permitir a adesão celular. O ensaio de resazurina foi realizado em ambos os momentos para avaliar a viabilidade celular. Para isso, foi adicionada solução de resazurina $3,14\ mg/mL$ ao meio celular e incubada por 6 horas numa concentração de 10%. A fluorescência foi medida (560 nm de excitação e emissão 590 nm) num leitor de microplacas (Biotech Synergy HT).

A forma reduzida, resorufina, é rosa e altamente fluorescente, e a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas que respiram. Assim age como um indicador direto da saúde celular, deteta o nível de oxidação durante a respiração, medindo quantitativamente a viabilidade celular e a citotoxicidade.⁶⁵

Capítulo IV: Resultados e Discussão

4.1 Microscopia eletrônica de varrimento

Na otimização dos pilares vários polímeros foram testados, nomeadamente os de PLLA, os de PLLA+SEBS, os de PVDF Grandes e Pequenos, e finalmente os de PVDF+Fe₃O₄

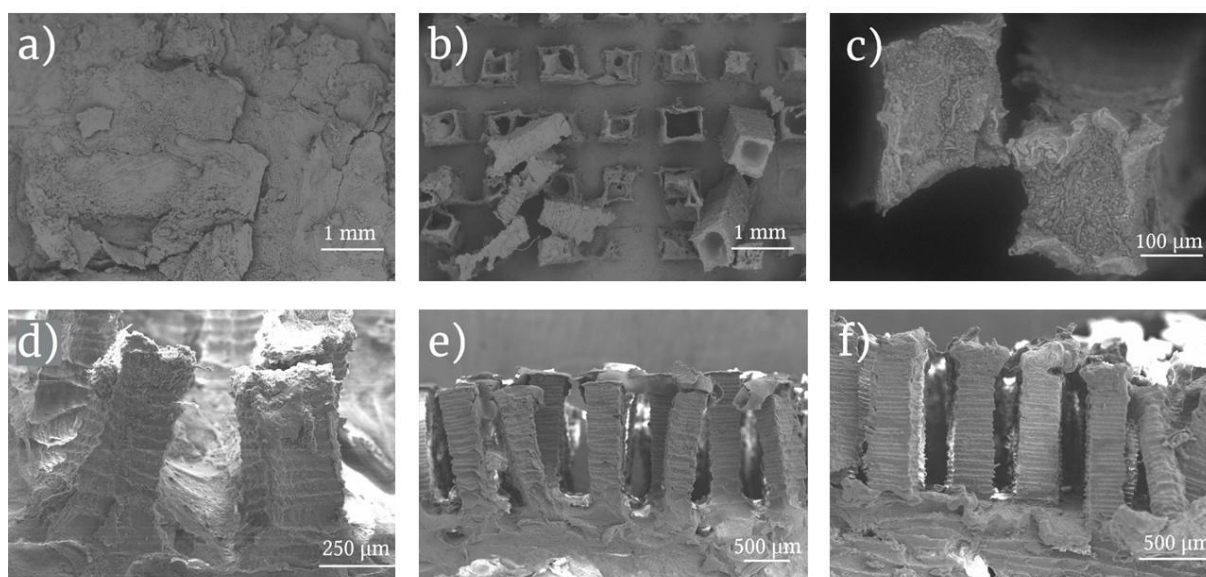


FIGURA 15 - IMAGENS RETIRADAS POR SEM DOS PILARES DE: A) PLLA AMPLIADO 27X, B) PLLA+SEBS AMPLIADO 42X, C) PVDF PEQUENOS AMPLIADO 200X, D) PVDF GRANDES AMPLIADOS 100X, E) PVDF GRANDES COM Fe₃O₄, E F) PVDF PEQUENOS COM Fe₃O₄.

Grandes e Pequenos (Figura 15). Nos resultados com o PLLA denota-se apenas a formação de uma base opaca, os pilares formados eram frágeis e quebradiços, partindo-se ao longo do processo. Para melhorar a maleabilidade e resistência no processo de síntese, foi misturado PLLA e SEBS, um polímero com propriedades elásticas, usualmente com um comportamento semelhante ao de uma borracha, é frequentemente usado como modificador de impacto, flexibilizador ou endurecedor.⁶⁴ Os pilares obtidos desta mistura de polímeros foram significativamente melhores. Foi possível verificar a presença de pilares, alguns partidos, outros com uma estrutura oca e inconsistente, no entanto ainda há lugar para otimizações. O PVDF é um polímero com propriedades piezoelétricas e uma boa maleabilidade e resistência, os resultados com este polímero foram substancialmente melhores, uma vez que os pilares obtidos são sólidos e têm uma estrutura consistente.

Quatro amostras diferentes foram sintetizadas e caracterizadas, nomeadamente, pilares de PVDF grandes e pequenos, pilares de PVDF com Fe_3O_4 grandes e pequenos. Os pilares pequenos após a síntese foram secados ao ar, onde perdem toda a água na sua constituição ficando pequenos, enquanto que os grandes, foram colocados numa caixa de petri fechados preservando a humidade e a água na sua constituição. Das imagens obtidas foram retiradas as medidas de altura dos pilares, largura da superfície e espaçamentos entre os pilares (Figura 16).

Ao analisar os resultados, é possível verificar de uma forma geral que os pilares grandes não apresentam a distinção esperada dos pilares pequenos (maior altura, maior espaçamento e maior largura superficial). Isto deve-se ao facto do maior tamanho dos pilares pela presença de água no seu interior. Durante o processo de vácuo anterior ao SEM, a humidade do ar é extraída, o que por sua vez desidrata os pilares, este processo é contínuo até o vácuo desejado ser atingido, no qual os pilares já perderam toda a água na sua constituição e, portanto, acabam por não ser analisados no seu tamanho original.

Verificando a altura dos pilares pequenos com e sem ferrites é possível verificar que o tamanho é muito semelhante e que não existem diferenças significativas na altura dos pilares. Nos pilares grandes, as diferenças são bastante significativas. O processo de secagem acelerado do vácuo, absorve toda a água em apenas alguns minutos, podendo ficar mais massa na base ou nos pilares. No caso das amostras medidas, a magnética teve uma maior perda de massa na zona da base, dando um maior tamanho aos pilares, enquanto na amostra de controlo, o oposto aconteceu, os pilares diminuíram aproximando-se da base.

A largura da superfície dos pilares pequenos de PVDF com ferrites ($260 \pm 21 \mu\text{m}$) e sem

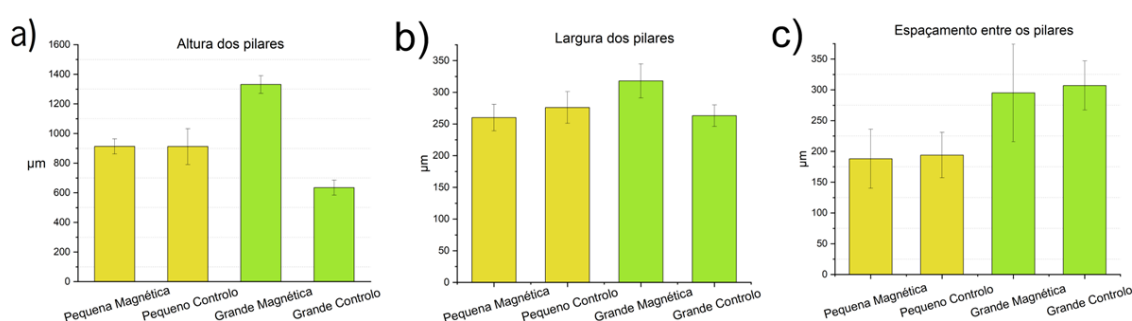


FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA: A) ALTURA, B) LARGURA E C) ESPAÇAMENTO MÉDIO DOS PILARES DE PVDF.

ferrites ($276 \pm 25 \mu\text{m}$) apresenta, como esperado, uma diferença inferior ao desvio padrão, o que também não é um desvio significativo. Nas medidas de largura superficial dos pilares grandes, a amostra magnética apresenta uma largura maior do que a amostra de controlo, o que está em concordância com a altura dos pilares. Os que ficaram mais altos, ficaram também com

uma maior área superficial, enquanto os que perderam massa, perderam altura e área de superfície, resultando num volume total menor. Verificando o espaçamento entre os pilares, é possível observar que os pequenos estão em concordância, os magnéticos com $188 \pm 48 \mu\text{m}$ e os de PVDF com $194 \pm 37 \mu\text{m}$. As amostras grandes, por sua vez, têm um maior espaçamento do que as amostras pequenas estando as amostras magnéticas ($295 \pm 81 \mu\text{m}$), semelhantes às de controlo ($307 \pm 40 \mu\text{m}$).

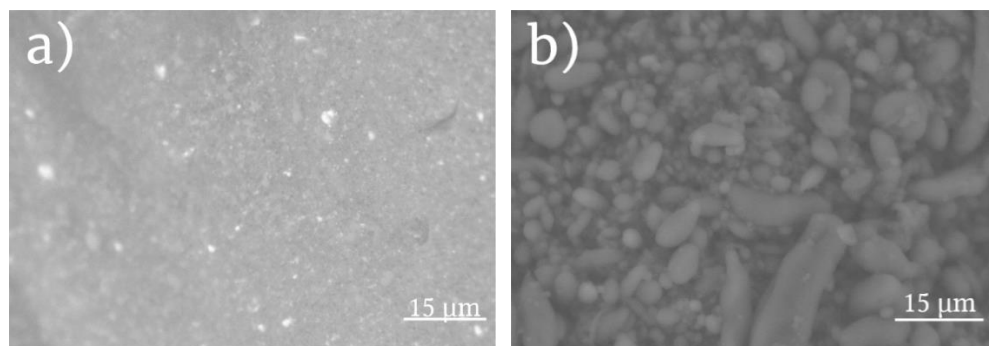


FIGURA 17 - IMAGENS RETIRADAS POR SEM, AMPLIADAS 1500X, DOS PILARES DE PVDF DESENVOLVIDOS: A) GRANDES MAGNÉTICOS E B) GRANDES DE CONTROLO.

Na figura 17, obtida sem a deposição de ouro, é possível verificar a presença de uns pontos brilhantes o que provavelmente indica a presença dos óxidos de ferro na área superficial dos pilares magnéticos. Nas imagens dos pilares de controlo ampliadas 1500x denota-se a estrutura plástica do PVDF e a ausência de ferrites.

4.2 Goniómetro de ângulo de contacto

A afinidade dos pilares à água foi analisada pelo ângulo de contacto e os resultados obtidos apresentados na Figura 18. É possível verificar que os pilares pequenos de controlo apresentaram um ângulo de contacto de $104 \pm 11^\circ$, enquanto nas amostras pequenas magnéticas denotou-se uma melhor afinidade à água, com um ângulo de contacto de $93 \pm 12^\circ$. Assim, os resultados indicam que ambas as amostras são hidrofóbicas. Nas amostras grandes de controlo e magnéticas, não se formou um ângulo de contacto, uma vez que a gota de água era absorvida imediatamente para o interior dos pilares. Isto poderá dever-se à quantidade de água que está presente no interior do pilar, isso faz com que a gota seja imediatamente absorvida.

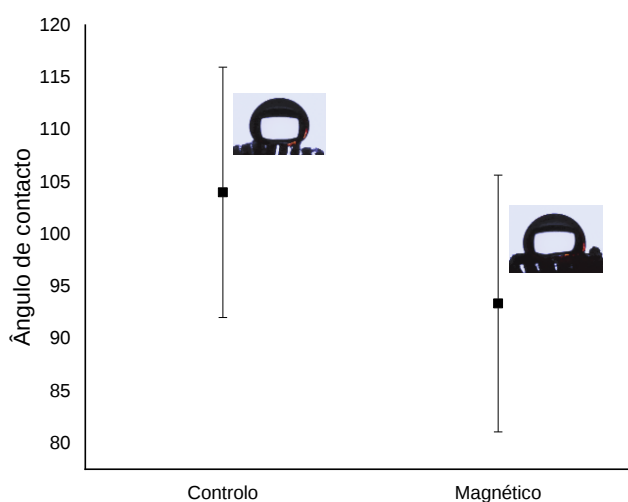


FIGURA 18 GRÁFICO REPRESENTATIVO DO ÂNGULO DE CONTACTO DOS PILARES PEQUENOS DE CONTROLO E MAGNÉTICOS.

4.3 Teste de Absorção

Dada a hidrofobicidade dos pilares pequenos de PVDF de controlo e magnéticos, é necessário perceber se os pilares são molháveis pelo meio de cultura celular. Assim, um teste de absorção foi realizado para verificar se após a submersão os pilares irão alterar o seu grau de molhabilidade e absorver a água (figura 19). Na figura 19 é possível perceber que em 24 horas os pilares pequenos de controlo e magnéticos absorveram água e cresceram em volume. No caso dos pilares magnéticos denotou-se um crescimento de 10.4%, semelhante aos de controlo com um crescimento de 15.7%.

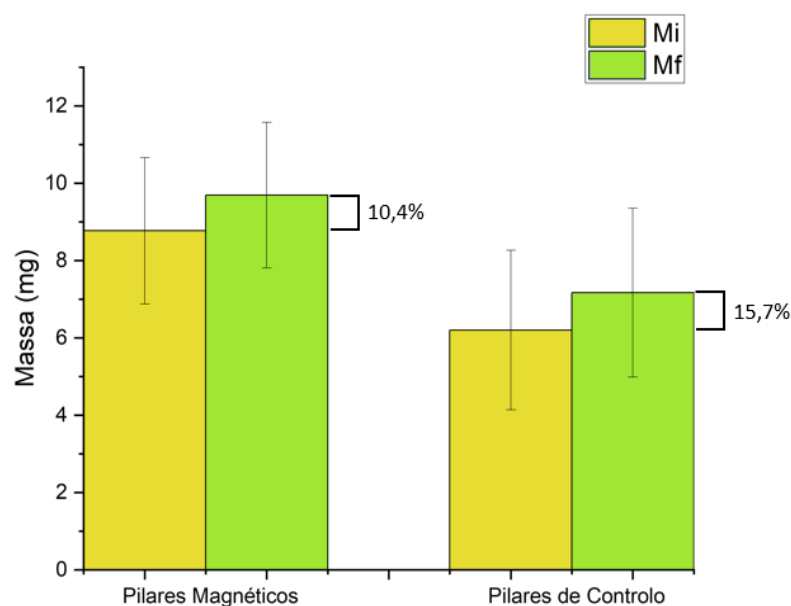


FIGURA 19 - GRÁFICO DE BARRAS DO TESTE DE ABSORÇÃO DOS PILARES PEQUENOS DE CONTROLO E MAGNÉTICOS. MI É A MASSA INICIAL E MF A MASSA FINAL.

4.4 Magnetômetro de amostra vibrante

Para determinar as propriedades magnéticas das amostras, o VSM foi executado (Figura 20).

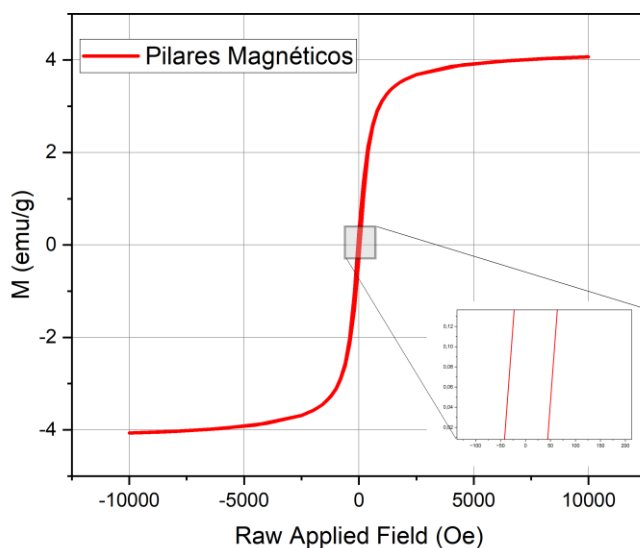


FIGURA 20 - GRÁFICO DE SCAN DE VSM DOS PILARES MAGNÉTICOS PEQUENOS.

Na Figura 20 é possível verificar que os limites -10000 Oe e 10000 Oe são o campo no qual as nanopartículas atingem a magnetização de saturação, ou seja, a partir do qual não é possível aumentar mais a magnetização da amostra. A coercividade detectada na imagem por ampliação está compreendida entre os valores de 50 e -50 Oe, um intervalo insignificativo visto que a resolução usada é de 200 Oe, e, portanto, denota-se a ausência de uma curva de histerese, característica das partículas superparamagnéticas.

Na Figura 21 está representada a curva de magnetização de 1 g de partículas de Fe_3O_4 . O campo de saturação é atingido aos 47 emus. De acordo com esta informação é possível determinar a concentração de nanopartículas no compósito magnético através da equação 6.

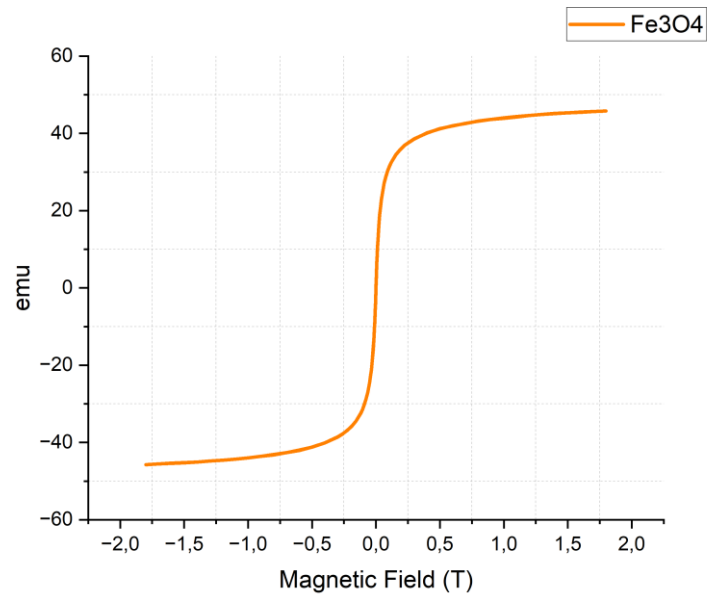


FIGURA 21 - GRÁFICO D SCAN DE VSM DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe₃O₄.

$$Fe_3O_4 \text{ wt. \%}_{\text{compósito}} = \frac{100 \times 4.296}{47} = 9,1\% \quad (6)$$

A concentração de nanopartículas no compósito magneto-elétrico corresponde a 9.1%, valor que corresponde ao esperado visto que o compósito foi produzido com 10% de nanopartículas. A ligeira diferença (entre a concentração esperada e a real) pode ser resultante da perda residual de vestígios de nanopartículas durante o processo de síntese.

4.5 Raios X do OSA e SA

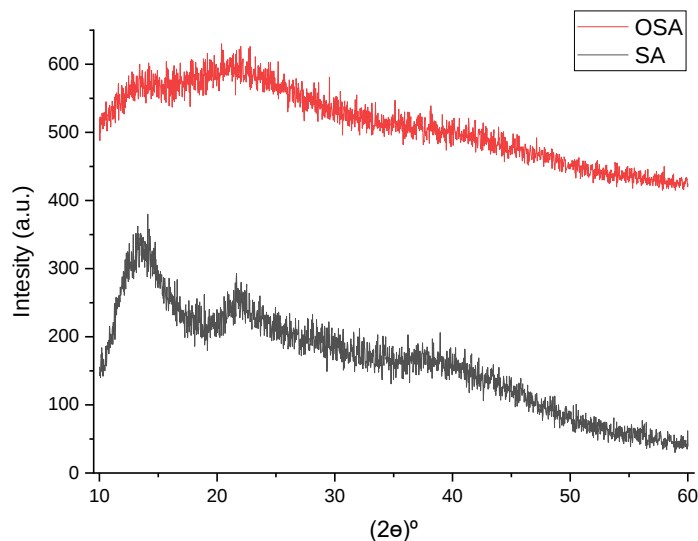


FIGURA 22 - SCAN DE RAIOS-X DO ALGINATO DE SÓDIO E DO ALGINATO DE SÓDIO OXIDADO.

Os resultados obtidos (Figura 22) evidenciam os picos do alginato e do alginato oxidado⁴⁷, no entanto com uma intensidade muito menor. Isto pode dever-se a diversas razões, nomeadamente: a percentagem de oxidação poderá não ter atingido a esperada, contaminações na amostra ou falta de vácuo no liofilizador o que potenciou a presença de água. Assim, uma análise por FTIR foi realizada para confirmar a oxidação do alginato de sódio.

4.6 Espectroscopia de infravermelho transformada de Fourier – reflexão total atenuada

O FTIR é uma técnica utilizada para detetar pequenas diferenças na conformação e estrutura das moléculas. Assim, é possível verificar a oxidação do alginato de sódio por esta técnica (Figura 23).

É possível observar um pequeno pico ampliado, situado nos 1740 cm^{-1} , que é indicativo da presença do alginato oxidado.⁶⁷ A ligação covalente do RGD ao OSA é uma estratégia recente pelo que não existem ainda estudos com esta caracterização. As diferenças observadas por FTIR, entre o OSA e o OSA+RGD são o desvio do maior pico, dos 1017.5 para os 1014 cm^{-1} .

As características piezoelétricas do PVDF manifestam-se na fase cristalina β . Para verificar a sua presença, é necessário determinar corretamente o teor de fase β em cada uma das

amostras. O FTIR foi usado para identificar e quantificar a fase β de amostras de controle e magnéticas, com os resultados apresentados na Figura 24.

É verificável uma maior evidência dos picos α (761, 795 e 968 cm^{-1}) nas amostras de controle (preto e vermelho) comparativamente às amostras magnéticas. No entanto, os picos correspondentes à fase β (839 e 877 cm^{-1}) estão mais evidentes nos pilares magnéticos (verde e azul).

Os valores de transmitância retirados do gráfico nos picos 761 e 840 cm^{-1} , são convertidos para absorvância através da equação 2.

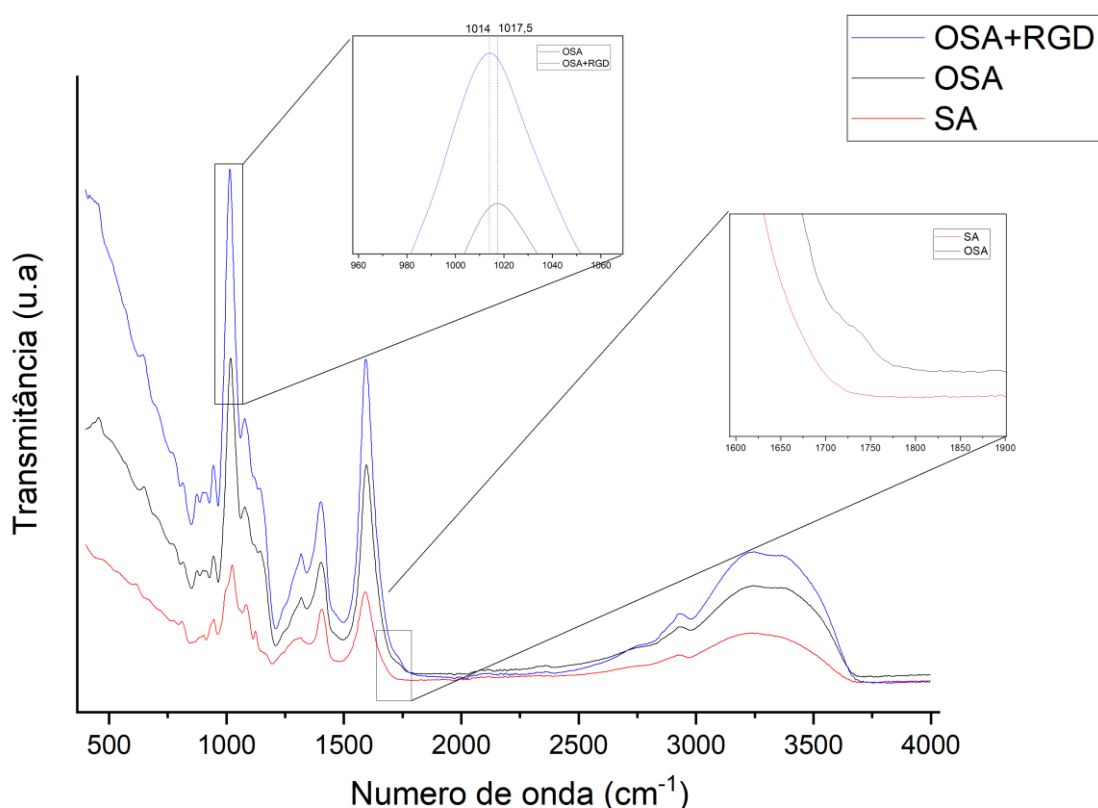


FIGURA 23 - ANÁLISE POR FTIR-ATR DO ALGINATO DE SÓDIO (SA), ALGINATO DE SÓDIO OXIDADO (OSA) E ALGINATO DE SÓDIO OXIDADO LIGADO AO RGD (OSA+RGD).

Nesta amostra, contendo apenas as fases α e β é usada a equação 3 para calcular a fração relativa de Fase β .³⁷ Os dados e resultados estão dispostos na tabela 1:

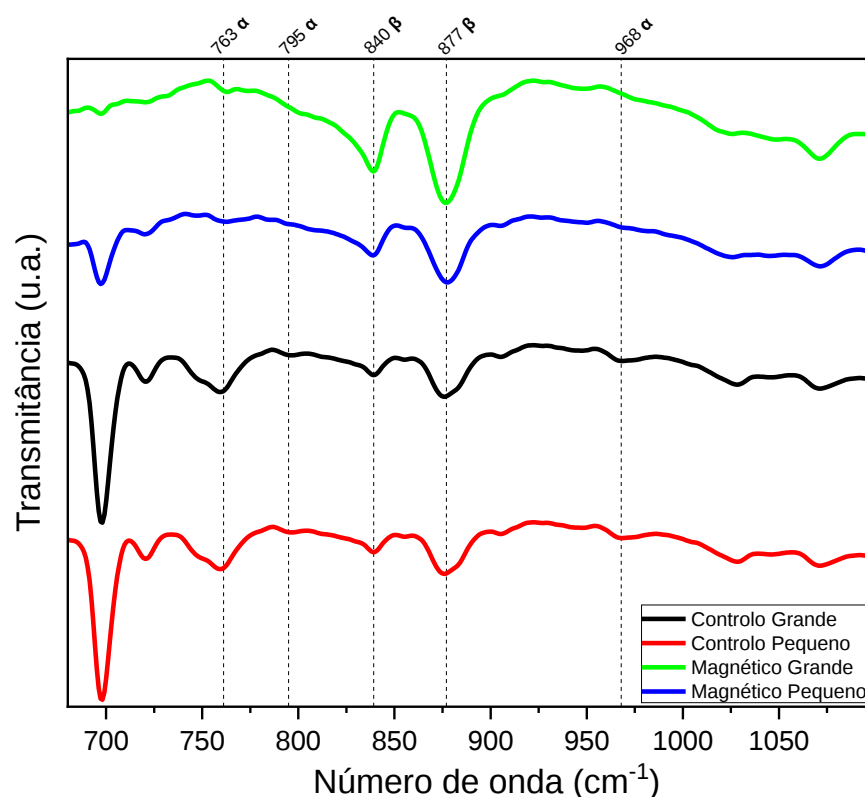


FIGURA 24 - GRÁFICO DO SCAN DE FTIR-ATR DAS AMOSTRAS DE CONTROLO E MAGNÉTICAS, COM EVIDÊNCIA AOS PICOS ALFA E BETA.

TABELA 1 - IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DOS QUAIS FORAM RETIRADOS OS VALORES, BEM COMO A TRANSMITÂNCIA, ABSORVÂNCIA E O VALOR FINAL DE FRAÇÃO RELATIVA DE FASE BETA.

	Número de onda	Transmitância	Absorvância	Fração relativa de fase β
Controlo pequeno	763 α	92,88	0,032	48,10%
	840 β	91,73	0,0375	
Controlo grande	763 α	93,94	0,027	37%
	840 β	95,45	0,02	
Magnético pequeno	763 α	99,1	0,0039	80,90%
	840 β	95,3	0,0209	
Magnético grande	763 α	98,8	0,0054	87,40%
	840 β	89,7	0,0474	

Ao olhar para estes resultados é possível verificar que a fração relativa de fase β nas amostras grandes e pequenas não apresenta diferenças significativas, e, portanto, que o volume de água nas amostras não influencia a conformação química da fase β , permanecendo constante independentemente do volume de água. Comparando as amostras com e sem ferrites, denota-se uma diferença de aproximadamente 40% de fase β a mais nos pilares magnéticos. Isto indica

que, como esperado, a presença de ferrites induz a fase β ,⁴⁰ isto pode ser devido, mais uma vez, às cargas das nanopartículas. A fase β é a organização do Flúor (carga negativa) e do Hidrogénio (carga positiva), em diferentes polos da molécula. Num ambiente em que apenas existe a molécula de PVDF com cargas positivas e negativas, estas vão se dispor alternadamente, formando a fase α , mais predominante nos pilares de controlo. Nos pilares magnéticos a abundância de ferrites ou cargas, irão estabilizar as cargas positivas e negativas do hidrogénio e do flúor, não sendo necessário estas se alternarem para estabilizar as próprias cargas, havendo assim a predominância de fase β .

4.7 Calorimetria diferencial de varrimento

Neste trabalho, o DSC foi empregue com o objetivo de investigar a percentagem de cristalinidade dos pilares pequenos e grandes, com e sem ferrites. A importância desta característica no PVDF reflete-se na influência que possuiu na piezoelectricidade do material visto que a interface entre a fase cristalina e amorfa é importante na ocorrência de fenómenos piezoelétricos.

Os termogramas obtidos pela técnica de DSC estão apresentados na figura 25. Ao longo dos gráficos denota-se um desvio no fluxo de calor, em que este representa a transição do material da fase cristalina para a fase líquida. Conhecendo as transições cristalinas de PVDF no seu estado puro α e estado puro β , é possível determinar a fração de cristalinidade da amostra através da equação 4. A partir da figura 25, retirou-se a integral normalizada do desvio de fluxo de calor, denominada entalpia de fusão da amostra.

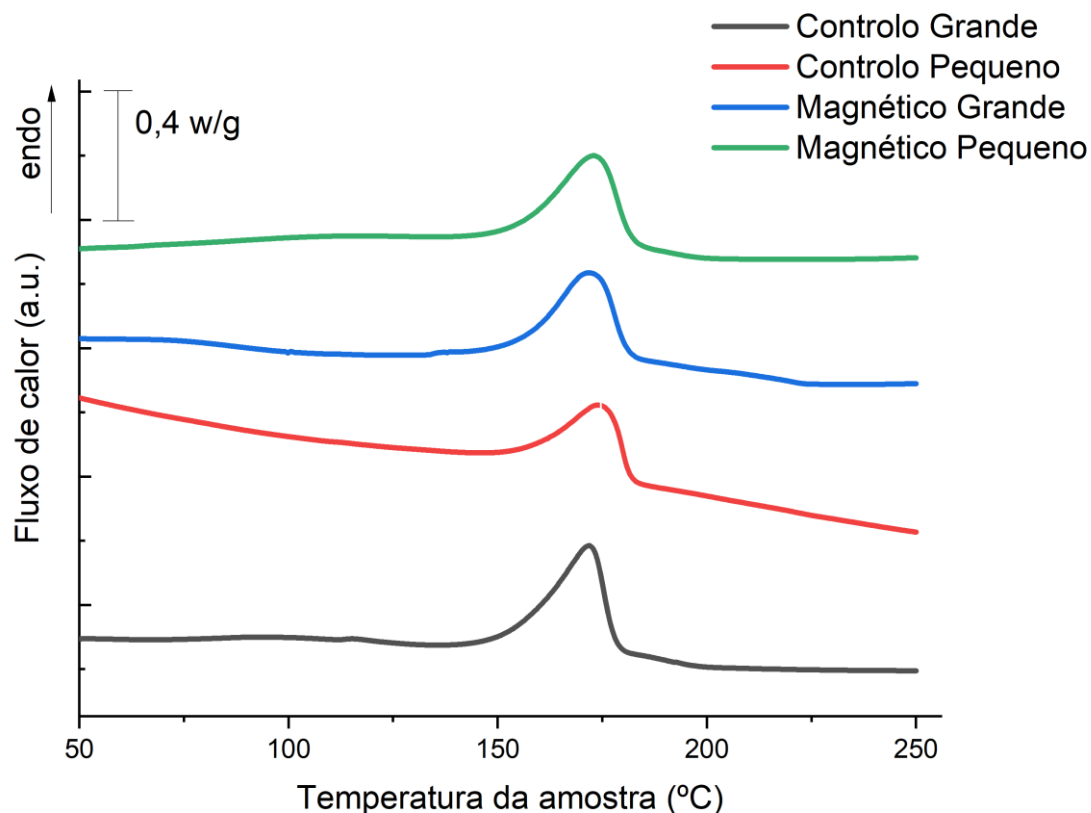


FIGURA 25 - GRÁFICO DE FLUXO DE CALOR EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DAS DIFERENTES AMOSTRAS PRODUZIDAS, OBTIDO POR DSC.

Através da integral normalizada (ΔH) é possível aplicar a equação 4 para calcular a percentagem de cristalinidade X_c .

Os resultados são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – ENTALPIA DE FUSÃO, PICO DA ENTALPIA E GRAUS DE CRISTALINIDADE DAS DIVERSAS AMOSTRAS OBTIDAS POR DSC. O ERRO ASSOCIADO É DE $\pm 2\%$.

Amostra	Wg (J/g)	Pico (°C)	Xc (%)
Controlo grande	37,93	171,75	39,57
Controlo pequeno	33,8	174,65	34,40
Magnético grande	32,86	171,97	32,18
Magnético pequeno	32,69	172,88	32,23

Os picos de DSC apresentam-se próximos de 172 °C, um valor superior a outras estruturas de PVDF^{67,68}, este efeito também é denotado em⁶⁷ e pode dever-se ao facto de ser um material com uma maior espessura, e, portanto, com mais forças não covalentes presentes que absorvem o calor na passagem de fases. Devido aos micropilares serem uma nova estrutura não existe registo da sua cristalinidade para comparação, servindo estes resultados para futuras referências. É verificado uma coercividade na cristalinidade dos pilares magnéticos, ambos com

32%. Nos pilares de controlo, a amostra de controlo pequena apresenta uma cristalinidade de 34% e a amostra de controlo grande de 39%. Esta diferença pode ser justificada pela quantidade de água presente na estrutura de controlo grande.⁶⁷ Durante a transição de fase sólido→líquido, para além da energia absorvida pelo composto, a água presente também absorve energia, isto resulta numa área maior na curva do fluxo de calor e consequentemente num maior valor da integral normalizada, assim através da equação 6 manifesta-se num aumento da cristalinidade.

4.8 Análise Mecânica Dinâmica

O comportamento mecânico dos pilares foi estudado, para verificar se estes são flexíveis perante as condições de moção dos pilares. (Figura 26)

Ao verificar estes resultados verifica-se que as amostras têm comportamentos mais semelhantes pela sua constituição do que pelo seu tamanho. É possível verificar que em todas as amostras o *storage modulus* é superior ao *loss modulus* o que indica que a amostra apresenta flexibilidade da moção dos pilares com pouca alteração da temperatura, o que seria prejudicial para as células. Na amostra de controlo grande, ambos os *modulus* decrescem aproximadamente até aos 1000 segundos, como também a força de amplitude necessária para a moção dos pilares, a partir da qual atinge um *plateau*, isto indica que os pilares diminuem a sua resistência aos estímulos do movimento, começando por mover-se menos e ir aumentando até um *plateau* ao longo do tempo. Olhando para os resultados do controlo pequeno são bastante semelhantes aos do controlo grande indicando também uma maior resistividade ao movimento que se vai dissipando até aos 1000 segundos. No entanto, olhando para a escala dos MPa é possível verificar que os módulos apresentam um valor mais baixo no controlo pequeno que no controlo grande, o que indica que estes são mais flexíveis ao movimento do que a amostra de controlo grande.

Nos pilares magnéticos o oposto acontece, os pilares magnéticos pequenos apresentam uma escala de *storage* e *loss modulus* superior à dos pilares magnéticos grandes. Isto deve-se à incorporação das ferrites no compósito, que enfraquece a interação de ligação interfacial entre as cadeias poliméricas o que resulta numa menor flexibilidade.^{69,70} É de notar também que, tal como nas amostras de controlo o *loss modulus*, mantêm-se em valores muito reduzidos e decresce até um *plateau* muito próximo de zero. O mesmo não acontece com *storage modulus*, que inicia com 17 MPa (magnético grande) e 69 MPa (magnético pequeno), valores muito superiores aos dos controlos, e cresce aproximadamente até aos 2000 segundos, comportando-se depois como um *plateau*. Isto deve-se às forças eletrostáticas das ferrites presentes na

amostra, que conferem rigidez ao compósito. É de notar também que a força de amplitude, mantêm-se em 1 N durante todo o ensaio, o que é também um indicativo da rigidez do compósito eletromagnético.

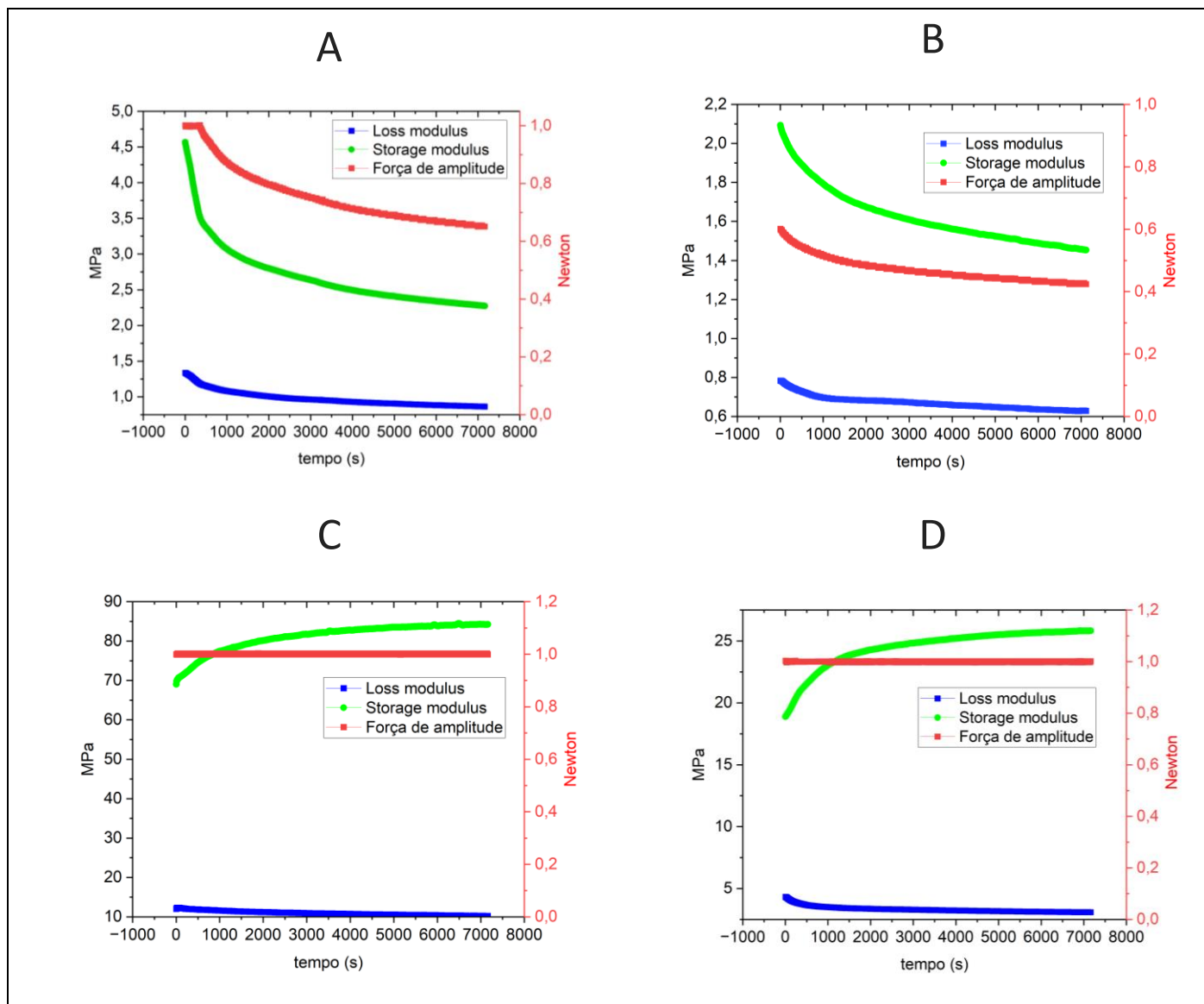


FIGURA 26 - GRÁFICOS DE ANÁLISE POR DMA DE: (A) CONTROLO GRANDE, (B) CONTROLO PEQUENO, (C) MAGNÉTICO GRANDE, E (D) MAGNÉTICO PEQUENO.

4.9 Citotoxicidade

Para os ensaios celulares os compósitos de pilares foram esterilizados por raios UV. De salientar que estes raios não penetram na água, ou em amostras contendo água na sua

constituição, pelo que apenas as amostras pequenas prosseguiram para a fase dos ensaios celulares. Assim, foi realizado primeiro o ensaio de citotoxicidade às amostras pequenas produzidas onde foram usadas 4 réplicas por cada tipo de amostra (figura 27).

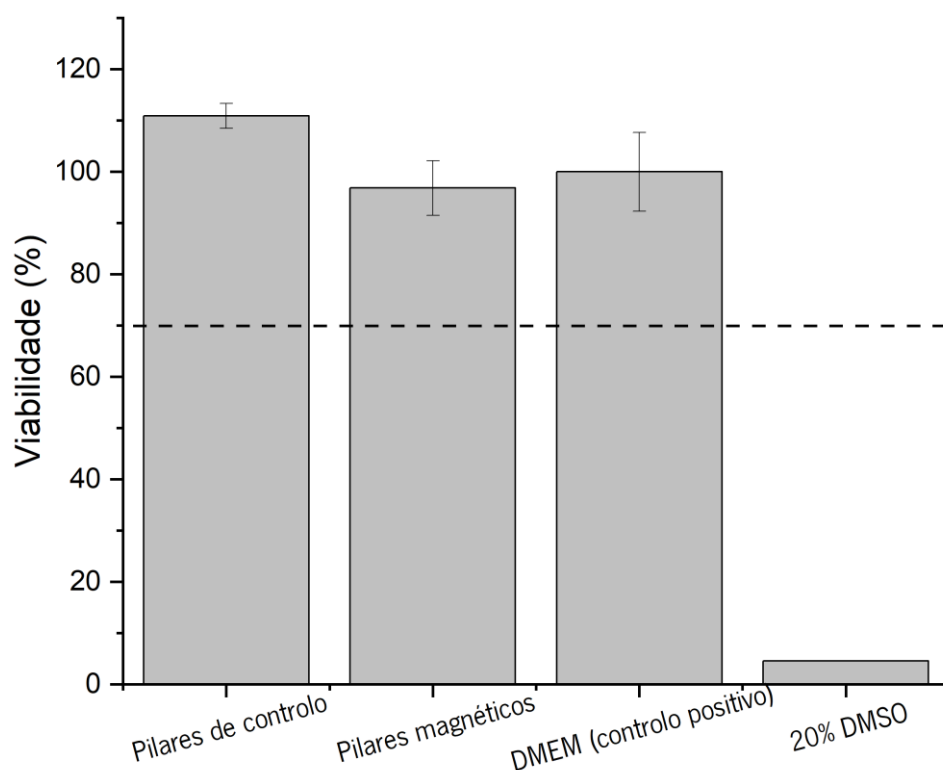


FIGURA 27 - VIABILIDADE CELULAR OBTIDA ATRAVÉS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE COM AS CÉLULAS SH-SY5Y EM CONTACTO COM O MEIO EXPOSTO ÀS DIFERENTES AMOSTRAS.

De acordo com a ISO 10993-5 as amostras são classificadas como não citotóxicas, quando apresentam uma viabilidade celular acima dos 70%. Sabe-se que o PVDF é não tóxico e biocompatível⁷⁶ e que baixas quantidades de ferrites também demonstraram não ser tóxicas⁷⁷, com este ensaio confirma-se a sua não toxicidade. Todas as amostras passaram no teste em conjunto com o controlo positivo que representa as células apenas no meio celular. O controlo negativo representa as células com meio e DMSO, e apresenta uma viabilidade celular abaixo dos 5% como expectável.

4.10 Proliferação

O estudo de proliferação foi realizado em condições estáticas nas amostras de micropilares pequenos de PVDF e de PVDF+Fe₃O₄ (Figura 28). Este estudo foi feito através do ensaio da resazurina. Olhando para os resultados é possível verificar que houve uma

proliferação celular em todas as amostras 24 horas após a adesão celular. No controlo denotou-se um aumento de 38% de células vivas, nos pilares de PVDF (pilares de controlo) um aumento de 41%, e nos pilares de PVDF+Fe₃O₄ as células cresceram 27%. Denota-se um crescimento mais lento nas amostras com ferrites, provavelmente devido à presença das ferrites que são desfavoráveis a um crescimento mais rápido no ensaio estático. Também se poderá dever ao facto de as ferrites alterarem a rigidez do material o que poderá afetar a afinidade e proliferação das células.

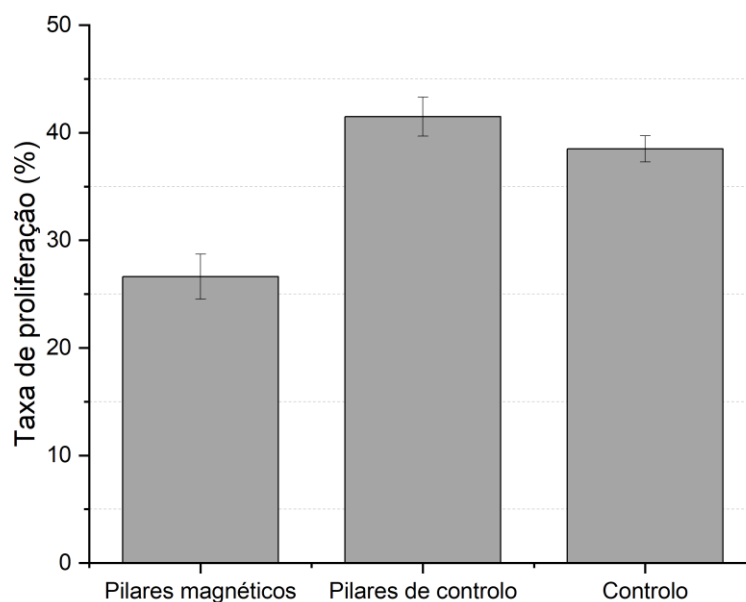


FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS 24 ÀS 48 HORAS NAS AMOSTRAS DE PILARES MAGNÉTICOS E DE CONTROLO (CÉLULAS EM CONTACTO COM O POÇO DE POLIESTIRENO).

Uma vez que ambos os pilares produzidos demonstraram promover a proliferação celular, o próximo passo será submetê-los a ensaios dinâmicos (através da utilização de um biorreator magnético) de forma a fornecer às células estímulos mecano-elétricos. Assim, a utilização de esta nova plataforma de pilares parece ser uma abordagem promissora para fornecer estímulos mecano-elétricos às células neuronais.

Capítulo V: Conclusões e Trabalho Futuro

5.1 Conclusões

Neste trabalho foi sintetizado com sucesso um novo *scaffold*, composto por PVDF e alginato de sódio oxidado, covalentemente ligado a RGD para crescimento neuronal. Este *scaffold* está dividido num compósito magneto-elétrico e num hidrogel. O novo compósito magneto-elétrico construído com PVDF com 80% de fase β apresenta-se sob a forma de pilares orientados verticalmente recheados no seu interior com nanopartículas de Fe_3O_4 que irão promover o movimento dos pilares e assim dar o estímulo elétrico aos neurónios mimetizando o ambiente natural do corpo humano. Estes micropilares foram caracterizados quanto à sua morfologia, cristalinidade, composição química, hidrofiliicidade, absorvidade, resistência mecânica e citotoxicidade, para verificar a qualidade do compósito, bem como a sua funcionalidade mecanicamente e em células.

Foi possível verificar que os compósitos produzidos não apresentam nenhuma citotoxicidade e promovem a proliferação celular de células SH-SY5Y.

Assim, é possível concluir que durante este trabalho foi criado um novo compósito, com potencial para fornecer estímulos magneto-elétricos de forma a mimetizar o organismo e potenciar o crescimento de células neuronais. Este compósito apresenta potencial também para crescimento de outras linhas celulares que detetem os estímulos elétricos como vantajosos para o seu desenvolvimento, como por exemplo, de mioblastos e osteoblastos. O compósito de PVDF também poderá ser usado para funcionar como um pequeno biorreator. Apesar do seu tamanho reduzido, tem potencial para fornecer estímulos elétricos ao ambiente evolvente de forma a promover o desenvolvimento celular. Assim, ao adicionar um pequeno íman com moção, serviria como um microbioreator.

5.2 Trabalho Futuro

A engenharia de tecidos sugere que um antigo sonho, ‘a substituição de partes do corpo humano’, pode ser realizado. Embora qualquer cientista sóbrio e reflexivo entenda o longo caminho para o sucesso desta ideia, a nossa sociedade está no caminho para a concretização dessa possibilidade.

Dito isto, para o trabalho futuro sugere-se mais caracterizações celulares como é o caso da expressão genética, mutagenicidade e teratogenicidade das células Sh-sy5y e de outras linhas celulares até, por fim chegar aos ensaios em animais.

É relevante iniciar ensaios de proliferação dinâmicos nas mesmas condições dos estáticos de forma a verificar experimentalmente o efeito dos estímulos ME nas células neuronais. Recomenda-se também a adição de ensaio de proliferação estáticos e dinâmicos no hidrogel de alginato de sódio oxidado juntamente com o compósito para verificar a eficácia do *scaffold* como um todo.

Em termos de otimização do compósito pode-se otimizar o tamanho dos pilares, torná-los mais pequenos com o mesmo método através de uma impressora 3D de maior precisão/resolução, ou investigar outro método para uma morfologia mais favorável.

Testes de proliferação com diferentes concentrações de nanopartículas de óxidos de ferro, para verificar qual a concentração mais favorável no desenvolvimento celular.

Otimização dos ciclos de estímulos magnetelétricos no biorreator, os ciclos utilizados foram com base em estímulos de mio e osteoblastos. Sendo as células neste estudo, neuronais, poderá haver uma necessidade de aumentar a frequência ou a intensidade dos estímulos.

Testes de degradação do hidrogel e sua otimização, consoante os estímulos magnetoelétricos e a proliferação celular para uma degradação completa durante a fase de proliferação celular no *scaffold*.

Construir um pequeno suporte com um íman móvel e verificar as potencialidades deste compósito como um biorreator.

Bibliografia

- 1- Wolter JR, Meyer RF. Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. Transactions of the American Ophthalmological Society. 1984;82:187
- 2- Viola J, Lal B, Grad O (14 October 2003). "The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field". ABT Associates Inc.
- 3- Langer R, Vacanti JP. May 14, 1993.". Tissue Engineering." Science.;260(5110):920-6.
- 4- Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala A, editors. Principles of tissue engineering. Academic press; 2020 Mar 26.
- 5- Sheerin F. Spinal cord injury: anatomy and physiology of the spinal cord. emergency nurse. 2004 Dec 1;12(8).
- 6- Spinal cord injury [Internet]. World Health Organization. World Health Organization; [citado 2021Jul3]. Disponível de: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>
- 7- Seeley R, Stephens T, Tate P. Anatomy & Physiology. 6ª ed. Loures: Lusociência; 2005
- 8- Bican O, Minagar A, Pruitt AA. The spinal cord: a review of functional neuroanatomy. Neurologic clinics. 2013 Feb 1;31(1):1-8.
- 9- Zhang Q, Shi B, Ding J, Yan L, Thawani JP, Fu C, Chen X. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair. Acta biomaterialia. 2019 Apr 1;88:57-77.
- 10- Hausmann OB. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. Spinal cord. 2003 Jul;41(7):369-78.
- 11- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radical Biology and Medicine. 2002 Jun 1;32(11):1102-15.
- 12- Badhiwala JH, Ahuja CS, Fehlings MG. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury: JNSPG 75th Anniversary Invited Review Article. Journal of Neurosurgery: Spine. 2018 Dec 20;30(1):1-8.
- 13- Milhorat TH, Capocelli AL, Anzil AP, Kotzen RM, Milhorat RH. Pathological basis of spinal cord cavitation in syringomyelia: analysis of 105 autopsy cases. Journal of neurosurgery. 1995 May 1;82(5):802-12.
- 14- Brommer B, Engel O, Kopp MA, Watzlawick R, Müller S, Prüss H, Chen Y, DeVivo MJ, Finkenstaedt FW, Dirnagl U, Liebscher T. Spinal cord injury-induced immune

- deficiency syndrome enhances infection susceptibility dependent on lesion level. *Brain*. 2016 Mar 1;139(3):692-707.
- 15- Ulndreaj A, Chio JC, Ahuja CS, Fehlings MG. Modulating the immune response in spinal cord injury. *Expert review of neurotherapeutics*. 2016 Oct 2;16(10):1127-9.
 - 16- Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter M, Druschel C, Curt A, Fehlings MG. Traumatic spinal cord injury. *Nature reviews Disease primers*. 2017 Apr 27;3(1):1-21
 - 17- Bryan WW, Medhi R, Marquez MD, Rittikulsittichai S, Tran M, Lee TR. Porous silver-coated pNIPAM-co-AAc hydrogel nanocapsules. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2019 Oct 4;10(1):1973-82.
 - 18- Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002 Nov 1;23(22):4307-14.
 - 19- Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*. 2004 Apr;428(6982):487-92.
 - 20- Ribeiro C, Sencadas V, Correia DM, Lanceros-Méndez S. Piezoelectric polymers as biomaterials for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015 Dec 1;136:46-55.
 - 21- Badylak SF. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant immunology*. 2004 Apr 1;12(3-4):367-77.
 - 22- Da Silva RM, Mano JF, Reis RL. Smart thermoresponsive coatings and surfaces for tissue engineering: switching cell-material boundaries. *TRENDS in Biotechnology*. 2007 Dec 1;25(12):577-83.
 - 23- Finkenstadt, V.L. Natural polysaccharides as electroactive polymers. *Appl Microbiol Biotechnol. Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005 Feb. 67, 735–745.
 - 24- Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnology and bioengineering*. 2005 Nov 20;92(4):492-500.
 - 25- Palza H, Zapata PA, Angulo-Pineda C. Electroactive smart polymers for biomedical applications. *Materials*. 2019 Jan;12(2):277.
 - 26- Plunkett N, O'Brien FJ. Bioreactors in tissue engineering. *Technology and Health Care*. 2011 Jan 1;19(1):55-69.
 - 27- Mondal S, Das S, Nandi AK. A review on recent advances in polymer and peptide hydrogels. *Soft Matter*. 2020;16(6):1404-54.

- 28- Schmidt CE, Shastri VR, Vacanti JP, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997 Aug 19;94(17):8948-53.
- 29- Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2009 Nov 1;15(11):3605-19.
- 30- Orr MB, Gensel JC. Spinal cord injury scarring and inflammation: therapies targeting glial and inflammatory responses. *Neurotherapeutics*. 2018 Jul;15(3):541-53.
- 31- Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, John Hurlbert R. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain*. 2012 Apr 1;135(4):1224-36.
- 32- Zhang Z, Rouabhia M, Wang Z, Roberge C, Shi G, Roche P, Li J, Dao LH. Electrically conductive biodegradable polymer composite for nerve regeneration: electricity-stimulated neurite outgrowth and axon regeneration. *Artificial organs*. 2007 Jan;31(1):13-22.
- 33- Mirfakhrai T, Madden JD, Baughman RH. Polymer artificial muscles. *Materials today*. 2007 Apr 1;10(4):30-8.
- 34- Ahmed F, Lalia BS, Kochkodan V, Hilal N, Hashaikh R. Electrically conductive polymeric membranes for fouling prevention and detection: A review. *Desalination*. 2016 Aug 1;391:1-5.
- 35- Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World journal of urology*. 2000 Feb;18(1):2-9.
- 36- Ning C, Zhou Z, Tan G, Zhu Y, Mao C. Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives. *Progress in polymer science*. 2018 Jun 1;81:144-62.
- 37- Lovinger AJ. In *Developments in Crystalline Polymers*; Bassett, DC, Ed. Applied Science: London. 1982;1:195.
- 38- Shahinpoor M, Bar-Cohen Y, Simpson JO, Smith J. Ionic polymer-metal composites (IPMCs) as biomimetic sensors, actuators and artificial muscles-a review. *Smart materials and structures*. 1998 Dec 1;7(6):R15.
- 39- Hujaya SD, Wohl BM, Engbersen JF, Paulusse JM. Responsive Layer-by-layer Films. In *Chemo-responsive Materials* 2015 Jun 26 (pp. 291-331). RCS Publishing.

- 40- Sousa D. Avaliação de compósitos magnetoelétricos para aplicações em Energy Harvesting e atuadores. Braga. Tese de mestrado em Engenharia Eletrónica Industrial e Computadores. – Universidade do Minho. 2014.
- 41- Wang Y, Sun C, Zhou E, Su J. Deformation mechanisms of electrostrictive graft elastomer. *Smart materials and structures*. 2004 Oct 21;13(6):1407.
- 42- Martins P, Lopes AC, Lanceros-Mendez S. Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in polymer science*. 2014 Apr 1;39(4):683-706.
- 43- Ishige R, Tokita M, Naito Y, Zhang CY, Watanabe J. Unusual formation of smectic A structure in cross-linked monodomain elastomer of main-chain LC polyester with 3-methylpentane spacer. *Macromolecules*. 2008 Apr 8;41(7):2671-6.
- 44- Lu Q, Han WJ, Choi HJ. Smart and functional conducting polymers: application to electrorheological fluids. *Molecules*. 2018 Nov;23(11):2854.
- 45- Martins P, Lopes AC, Lanceros-Mendez S. Electroactive phases of poly (vinylidene fluoride): Determination, processing and applications. *Progress in polymer science*. 2014 Apr 1;39(4):683-706.
- 46- Correia HM, Ramos MM. Quantum modelling of poly (vinylidene fluoride). *Computational Materials Science*. 2005 Apr 1;33(1-3):224-9.
- 47- Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale research letters*. 2012 Dec;7(1):1-3.
- 48- Damaraju SM, Wu S, Jaffe M, Arinzeh TL. Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function. *Biomedical Materials*. 2013 Jun 17;8(4):045007.
- 49- Tran KA, Partyka PP, Jin Y, Bouyer J, Fischer I, Galie PA. Vascularization of self-assembled peptide scaffolds for spinal cord injury repair. *Acta biomaterialia*. 2020 Mar 1;104:76-84.
- 50- Sandrow-Feinberg HR, Houlé JD. Exercise after spinal cord injury as an agent for neuroprotection, regeneration and rehabilitation. *Brain research*. 2015 Sep 4;1619:12-21.
21. Chan BP, Leong KW. scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal*. 2008 Dec;17(4):467-79.
- 51- Lanza R, Langer R, Vacanti JP, Atala A, editors. *Principles of tissue engineering*. Academic press; 2020 Mar 26.

- 52- Hasan A, Morshed M, Memic A, Hassan S, Webster TJ, Marei HE. Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International journal of nanomedicine*. 2018;13:5637.
- 53- Park H, Park HJ, Kim JA, Lee SH, Kim JH, Yoon J, Park TH. Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilms by hyperthermia using superparamagnetic nanoparticles. *Journal of microbiological methods*. 2011 Jan 1;84(1):41-5.
- 54- Ribeiro S, Ribeiro C, Carvalho EO, Tubio CR, Castro N, Pereira N, Correia V, Gomes AC, Lanceros-Méndez S. Magnetically activated electroactive microenvironments for skeletal muscle tissue regeneration. *ACS applied bio materials*. 2020 May 29;3(7):4239-52.
- 55- Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, Gonçalves R, Cardoso VF, Lanceros-Mendez S. Electroactive poly (vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature protocols*. 2018 Apr;13(4):681-704.
- 56- Tom VJ, Kadakia R, Santi L, Houlé JD. Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to a spinal cord injury site promotes anatomical but not functional plasticity. *Journal of neurotrauma*. 2009 Dec 1;26(12):2323-33.
- 57- Theodore N, Hlubek R, Danielson J, Neff K, Vaickus L, Ulich TR, Ropper AE. First human implantation of a bioresorbable polymer scaffold for acute traumatic spinal cord injury: a clinical pilot study for safety and feasibility. *Neurosurgery*. 2016 Aug 1;79(2):E305-12.
- 58- Mirfakhrai T, Madden JD, Baughman RH. Polymer artificial muscles. *Materials today*. 2007 Apr 1;10(4):30-8.
- 59- Lin H, Chen B, Wang B, Zhao Y, Sun W, Dai J. Novel nerve guidance material prepared from bovine aponeurosis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2006 Dec 1;79(3):591-8.
- 60- Pritchard CD, Slotkin JR, Yu D, Dai H, Lawrence MS, Bronson RT, Reynolds FM, Teng YD, Woodard EJ, Langer RS. Establishing a model spinal cord injury in the African green monkey for the preclinical evaluation of biodegradable polymer scaffolds seeded with human neural stem cells. *Journal of neuroscience methods*. 2010 May 15;188(2):258-69.
- 61- Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomy & Physiology*. 6^a ed. Loures: Lusociência; 2005

- 62- Ribeiro S, Ribeiro C, Carvalho EO, Tubio CR, Castro N, Pereira N, Correia V, Gomes AC, Lanceros-Méndez S. Magnetically activated electroactive microenvironments for skeletal muscle tissue regeneration. *ACS applied bio materials*. 2020 May 29;3(7):4239-52.
- 63- Hermenegildo B, Ribeiro C, Pérez-Álvarez L, Vilas JL, Learmonth DA, Sousa RA, Martins P, Lanceros-Méndez S. Hydrogel-based magnetoelectric microenvironments for tissue stimulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019 Sep 1;181:1041-7.
- 64- Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003 Nov 1;24(24):4385-415.
- 65- Zhao Y, Tang F, Xiao Z, Han G, Wang N, Yin N, Chen B, Jiang X, Yun C, Han W, Zhao C. Clinical study of NeuroRegen scaffold combined with human mesenchymal stem cells for the repair of chronic complete spinal cord injury. *Cell transplantation*. 2017 May;26(5):891-900.
- 66- Antibodies, Proteins, Kits and Reagents for Life Science | Abcam [Internet]. Resazurin Assay Kit (Cell Viability) (ab129732) | Abcam; [citado 15 out 2022]. Disponível em: <https://www.abcam.com/resazurin-assay-kit-cell-viability-ab129732.html>
- 67- Wang H, Chen X, Wen Y, Li D, Sun X, Liu Z, Yan H, Lin Q. A Study on the Correlation between the Oxidation Degree of Oxidized Sodium Alginate on Its Degradability and Gelation. *Polymers*. 2022 Jan;14(9):1679.
- 68- Damaraju SM, Wu S, Jaffe M, Arinzeh TL. Structural changes in PVDF fibers due to electrospinning and its effect on biological function. *Biomedical Materials*. 2013 Jun 17;8(4):045007.
- 69- Melilli G, Lairez D, Gorse D, Garcia-Caurel E, Peinado A, Cavani O, Boizot B, Clochard MC. Conservation of the piezoelectric response of PVDF films under irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 2018 Jan 1;142:54-9.
- 70- Athawale VD, Kulkarni MA. Polyester polyols for waterborne polyurethanes and hybrid dispersions. *Progress in Organic Coatings*. 2010 Jan 1;67(1):44-54.
- 71- Suhasini A, Kumar KV, Maiyalagan T. Synthesis, thermal and magnetic behavior of iron oxide-polymer nanocomposites. *Science and Engineering of Composite Materials*. 2018 Jan 1;25(1):189-95.
- 72- Palacios-Pineda LM, Perales-Martinez IA, Lozano-Sanchez LM, Martínez-Romero O, Puente-Córdova J, Segura-Cárdenas E, Elías-Zúñiga A. Experimental investigation of the magnetorheological behavior of PDMS elastomer reinforced with iron micro/nanoparticles. *Polymers*. 2017 Dec 10;9(12):696.

- 73- Ribeiro C, Costa CM, Correia DM, Nunes-Pereira J, Oliveira J, Martins P, Gonçalves R, Cardoso VF, Lanceros-Mendez S. Electroactive poly (vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications. *Nature protocols*. 2018 Apr;13(4):681-704.
- 74- Guillot-Ferriols M, Rodríguez-Hernández JC, Correia DM, Carabineiro SA, Lanceros-Méndez S, Ribelles JG, Ferrer GG. Poly (vinylidene) fluoride membranes coated by heparin/collagen layer-by-layer, smart biomimetic approaches for mesenchymal stem cell culture. *Materials Science and Engineering: C*. 2020 Dec 1;117:111281.
- 75- Ribeiro C, Correia V, Martins P, Gama FM, Lanceros-Mendez S. Proving the suitability of magnetoelectric stimuli for tissue engineering applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016 Apr 1;140:430-6.
- 76- Gryshkov O, Al Halabi F, Kuhn AI, Leal-Marín S, Freund LJ, Förthmann M, Meier N, Barker SA, Haastert-Talini K, Glasmacher B. PVDF and P (VDF-TrFE) electrospun scaffolds for nerve graft engineering: a comparative study on piezoelectric and structural properties, and in vitro biocompatibility. *International journal of molecular sciences*. 2021 Oct 21;22(21):11373.
- 77- Ankamwar B, Lai TC, Huang JH, Liu RS, Hsiao M, Chen CH, Hwu YK. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology*. 2010 Jan 21;21(7):075102.