

Scaffolds de nanofibras termo-sensíveis para cultura de células estaminais

Gonçalo Filipe Fernandes Adriano

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Bioengenharia e Nanossistemas

Orientador: Prof. Doutor José Paulo Sequeira Farinha Co-Orientador: Prof. Doutor Carlos Miguel Calisto Baleizão

Júri

Presidente: Prof. Doutor Luís Joaquim Pina da Fonseca Orientador: Prof. Doutor Carlos Miguel Calisto Baleizão Vogal: Prof. Doutor Frederico Castelo Alves Ferreira

Dezembro de 2014

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente toda a confiança e apoio dado pelos meus orientadores durante todo o trabalho realizado, e pela atribuição deste trabalho que foi muito enriquecedor para mim.

Quero agradecer à minha família por todo o apoio dado durante todo o meu percurso académico, sem ele não teria conseguido chegar até aqui.

Quero agradecer à minha namorada por todo o apoio, confiança e amor que muito contribui para ter chegado atá aqui.

Quero agradecer à Carla Moura por toda a disponibilidade e ajuda neste trabalho, que foi essencial para que os resultados obtidos fossem os melhores.

Quero agradecer ao Maykel por ter sido o meu mentor e amigo no início deste trabalho, e por toda a disponibilidade e a ajuda na caracterização dos materiais.

Quero agradecer todo o companheirismo dos colaboradores do CQFM e do SCBL.

A todos vós dedico este trabalho, pois sem a vossa intervenção isto não seria possível.

Resumo

Esta tese tem como objectivo o desenvolvimento de scaffolds que permitam a libertação de células da sua superfície por diminuição da temperatura do meio de cultura. Numa primeira estratégia a superfície do scaffold foi funcionalizada com um polímero termo-sensível. Numa segunda abordagem desenvolveu-se uma estrutura de scaffold degradável por temperatura. A utilização de polímeros termo-sensíveis na cultura de células estaminais é uma alternativa ao uso de tratamentos enzimáticos, que frequentemente provocam a perda de função e deterioração dos tecidos. Foram produzidas por electrospinning nanofibras de policaprolactona com diâmetros de (500±20)nm, e posteriormente modificadas com um polímero termo-sensível produzido por polimerização de adição-fragmentação reversível das cadeias do monómero 2-(2'-metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO₂MA). Os scaffolds termosensíveis foram obtidos por funcionalização das nanofibras de policaprolactona com o polímero poli(2-(2'-metoxietoxi)etil-metacrilato), p(MEO₂MA),cuja temperatura critica de solução mínima é de 27°C. O segundo tipo de scaffold foi produzido por electrospinning de uma mistura de policaprolactona com o polímero poli(2-(2'-metoxietoxi)etil-metacrilato), p(MEO₂MA), em várias proporções, originando scaffolds termo-degradáveis. A cultura de células mesenquimais com os scaffolds produzidos possibilitou o estudo da adesão, proliferação e libertação celular. Foram obtidos resultados promissores em termos de proliferação celular nos scaffolds de nanofibras termo-sensíveis e em termos de libertação celular por temperatura nos scaffolds termo-degradáveis, com uma taxa de libertação média de 50% após dois ensaios, e uma taxa de libertação celular superior a um método de libertação enzimático para os mesmos scaffolds.

Palavras-chave: Policaprolactona, 2-(2'-metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO₂MA), Electrospinning, Células mesenquimais, *Scaffolds* termo-sensíveis, *Scaffolds* termo-degradáveis.

Abstract

This thesis aims at the development of scaffolds to allow of cells from the surface by temperature decrease. An initial strategy the surface of the scaffold has been modified with a thermo-sensitive polymer. In a second approach the structure of the scaffold is degraded irreversibly by temperature. The use of thermo-responsive polymers on the culture of stem cells is an alternative to using the enzymatic treatments, which often cause the loss of function and deterioration of the tissues. Were produced by electrospinning nanofibers of polycaprolactone (PCL) with diameters of 500±20nm, which were later modified with thermo-sensitive polymer produced by reversibly addition-fragmentation chain polymerization of the monomer 2-(2'-methoxyethoxy)ethyl-methacrylate (MEO₂MA). The thermosensitive scaffolds were obtained by functionalization of the nanofibers of polycaprolactone with the polymer, p(MEO₂MA), whose low critical solution temperature is 27°C. The second type of scaffold was produced by electrospinning from a mixture of polycaprolactone with p(MEO₂MA) in various proportions, giving rise to the thermo-degradable scaffolds. The culture of mesenchymal stem cells with the scaffold produced allowed the study of adhesion proliferation and cell release. Promising results were obtained in terms of cell proliferation for thermo-sensitive nanofibers scaffolds, and in terms of cellular release by temperature on thermo-degradable scaffolds, with an average cell release rate of 50% after two trials, and a superior cell release rate to enzymatic treatment method for the same scaffolds.

Keywords: Polycaprolactone, 2-(2'-methoxyethoxy)ethyl-methacrylate (MEO₂MA), Electrospinning, mesenchymal cells, Thermo-sensitive scaffolds and Thermo-degradable scaffolds.

Índice

Agradecimer	ntosII
Resumo	
Abstract	IV
Lista de Tab	elasIX
Lista de Abre	eviaturasX
Capítulo 1- li	ntrodução1
1.1. Mot	ivação1
1.2. Obj	ectivos da tese1
1.3. Est	rutura da tese2
Capítulo 2 –	Estado da arte2
2.1. Cél	ulas estaminais2
2.1.1.	Tipos de células estaminais3
2.1.2.	Classificação das células estaminais3
2.1.3.	Matriz extracelular (ECM)4
2.1.4.	Cultura de células estaminais5
2.2. Bior	materiais para células estaminais6
2.2.1.	Tipos de biomateriais em engenharia de células e tecidos7
2.2.2.	Policaprolactona (PCL)8
2.2.3.	Características dos scaffolds9
2.2.4.	Scaffolds para engenharia de células e tecidos9
2.2.5.	Funcionalização de scaffolds para uso em engenharia de células e tecidos10
2.3. Ele	ctrospinning11
2.3.1.	Princípio de funcionamento do <i>electrospinning</i> 11
2.3.2.	Parâmetros de funcionamento do <i>electrospinning</i> 12
2.3.3.	Tipos de colector
2.3.4.	Scaffolds de nanofibras14
2.4. Poli	ímeros inteligentes14
2.4.1.	Tipos de polímeros inteligentes15
2.4.2.	2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO ₂ MA)17
2.4.3.	Polimerização via transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação 18
Capítulo 3 –	Materiais e métodos21
3.1. Sca	affolds de nanofibras de policaprolactona termo-sensíveis21
3.1.1.	Preparação de nanofibras de policaprolactona21

3.1.2. Preparação e caracterização dos polímeros termo-sensíveis 2(2-metoxietoxi)etil- metacrilato (MEO ₂ MA) e 2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato-co-N-Acriloxisuccinimida [MEO ₂ MA-co-NAS]	- 22
3.2. Scaffolds termo-degradáveis de MEO ₂ MA/Policaprolactona	27
3.2.1. Preparação e caracterização dos scaffolds termo-degradáveis de MEO ₂ MA/PCL	27
3.3. Caracterização dos scaffolds por técnicas de microscopia	28
3.4. Cultura de células	28
Capítulo 4 - Resultados e discussão	32
4.1. Caracterização dos scaffolds de nanofibras de policaprolactona	32
4.2. Caracterização dos polímeros MEO ₂ MA e MEO ₂ MA-co-NAS	36
4.3. Caracterização das nanofibras de PCL termo-sensíveis	39
4.4. Caracterização dos scaffolds termo-degradáveis	42
4.5. Resultados da proliferação e libertação de células nos scaffolds	48
4.5.1. Cultura de células mesenquimais com scaffolds termo-sensíveis	48
4.5.2. Cultura de células mesenquimais com scaffolds termo-degradáveis	52
5. Conclusão e perspectivas futuras	58
Referências bibliográficas	60

Lista de Figuras

Figura 1 – Diferenciação em diferentes tipos de células a partir de uma célula estaminal. ⁴			
Figura 2 - Caminhos de diferenciação das células estaminais. ⁴			
Figura 3 – Principais fontes de células estaminais do corpo humano. ⁵ 4			
Figura 4 - A) Composição e arquitectura da matriz extracelular. B) Ambiente e interações das células na matriz			
extracelular. ^{6,8}			
Figura 5 – Principais suportes de cultura estáticos. A) Placas de poços de poliestireno. B) Frascos de poliestireno.			
C) Placas de Petri de poliestireno. ⁹			
Figura 6 – Métodos de cultura dinâmicos. A) Frasco de rotação. B) Bioreactor de ondulação. ^{10,11}			
Figura 7 - Estratégia de cultura de <i>scaffolds</i> em engenharia de células e tecidos. ⁸ 7			
Figura 8 - Estrutura da policaprolactona			
Figura 9 – Principais componentes e montagem do <i>electrospinning</i> de placas paralelas. ³⁶			
Figura 10 – Principio físico da formação de fibras por <i>electrospinning</i> . ⁷⁶			
Figura 11 - Principais colectores para electrospinning: A) Colector rotativo; B) Placa de metal; C) Placas paralelas			
de metal; d) Colector em anel			
Figura 12 – Principais estímulos de resposta dos polímeros inteligentes. ⁷⁶			
Figura 13 – Diagrama de fases de Temperatura vs Composição de fases de um polímero termo-sensível. ⁴⁸ 16			
Figura 14 - Estrutura química do MEO ₂ MA. ⁷⁷			
Figura 15 – Principais componentes do MEO ₂ MA. A) Constituição de um monómero de MEO ₂ MA. b) Estrutura			
química de um monómero de MEO ₂ MA, onde a vermelho está representada a parte hidrofóbica do polímero e a			
azul a parte hidrofílica. ⁵¹			
Figura 16 – Estrutura do agente RAFT tritiocarbonato. ⁷⁸			
Figura 17 – Crescimento de uma cadeia na polimerização de RAFT. ⁶³			
Figura 18 – Mecanismo da polimerização de RAFT. ⁶³			
Figura 19 - Agente de RAFT 4-ciano-4-[(Dodecilsulfaniltiocarbonil) sulfanil] ácido pentanóico. ⁷⁹			
Figura 20 - Reacção de polimerização por RAFT do polímero MEO ₂ MA. ⁴⁹			
Figura 21 - Reação de polimerização por RAFT do polímero [MEO ₂ MA-co-NAS]. 49			
Figura 22 – Estrutura química do corante Cy5-amina. ⁸⁰			
Figura 23 - Estrutura química do corante Lucifer yellow. ⁸¹			
Figura 24 - Princípio teórico de funcionamento dos scaffolds de nanofibras termo-sensíveis. a) Células foram			
cultivadas sobre o scaffold com o polímero a 37°C e formam um tecido. b) Com o decréscimo da temperatura no			
meio celular as cadeias de polímero esticam-se e as células começam a soltar-se do scaffold com a sua matriz			
extracelular a verde. ¹⁵			
Figura 25 - Estratégia de investigação utilizada neste trabalho			
Figura 26 - Imagens de SEM de nanofibras de policaprolactona desalinhadas preparadas a partir de soluções de			
4% de PCL em HFP com e sem aminólise. A,B e C) Nanofibras desalinhadas de policaprolactona a 270×270µm,			
50×50µm e 15×15µm respectivamente. D,E e F) Nanofibras desalinhadas de policaprolactona com aminólise			
270×270µm, 50×50µm a 15×15µm			
Figura 27 - Imagens de nanofibras de policaprolactona desalinhadas preparadas a partir de soluções de 4% de			
PCL em HFP obtidas por AFM. Na primeira imagem à esquerda temos a imagem da topografia obtida pelo			
microscópio. Na imagem ao centro temos a imagem construída pela variação da amplitude do cantilever durante o			
varrimento. Na imagem à direita temos a imagem construída pela variação da frequência de oscilação do			
cantilever durante o varrimento da amostra			
Figura 28 - Histograma da frequência dos diâmetros das nanofibras de policaprolactona desalinhadas numa			
amostra com aminólise a cinzento e sem tratamento a preto. O diâmetro médio para as nanofibras de			
policaprolactona desalinhadas sem aminólise foi de 495±20 nm, enquanto para as nanofibras de policaprolactona			
desalinhadas com aminólise foi de 500±20 nm			
Figura 29 - Imagens de SEM de nanofibras de policaprolactona alinhadas preparadas a partir de soluções de 6%			
de PCL em HFP com e sem aminólise. A,B e C) Nanofibras de policaprolactona a 270x270µm, 50x50µm e			
15×15µm respectivamente. D,E e F) Nanofibras de policaprolactona com aminólise 270×270µm, 50×50µm e			
15×15µm respectivamente			
Figura 30 - Imagens de nanofibras de policaprolactona alinhadas preparadas a partir de soluções de 6% de PCL			
em HFP obtidas por AFM. Na primeira imagem à esquerda temos a imagem da topografia obtida pelo microscópio.			
Na imagem ao centro temos a imagem construída pela variação da amplitude do cantilever durante o varrimento.			
Na imagem à direita temos a imagem construída pela variação da frequência de oscilação do cantilever durante o			
varrimento da amostra			

Figura 31 - Gráfico da frequência dos diâmetros das nanofibras de policaprolactona alinhadas numa amostra com aminólise a cinzento e sem tratamento a preto. O diâmetro médio para as nanofibras de policaprolactona alinhadas sem aminólise foi de 500±20 nm, enquanto para as nanofibras de policaprolactona desalinhadas com aminólise foi Figura 32 – Gráfico da %Transmitância versus a Temperatura do polímero MEO₂MA numa solução de 1mg/ml a um comprimento de onda de 650nm e uma rampa de aquecimento de 1°C/min da solução de polímero num intervalo de 15°-35°C. Caracterização da LCST através de equações lineares em diferentes intervalos de temperatura: a equação que caracteriza o comportamento da zona a azul (y1=-0.0005x+100.42), da zona a Figura 33 - Gráfico da %Transmitância versus a Temperatura do polímero MEO₂MA-co-NAS numa solução de 1mg/ml a um comprimento de onda de 650nm e uma rampa de aquecimento de 1°C/min da solução de polímero num intervalo de 15°-35°C. Caracterização da LCST através de equações lineares em diferentes intervalos de temperatura: a equação que caracteriza o comportamento da zona a azul (y1=0.0103x+99.891), da zona a Figura 34 - Espectros de excitação (Tracejado) e emissão (Curvas preenchidas) das moléculas fluorescentes Lucifer yellow e Cy5. A Lucifer yellow possui um comprimento de onda de excitação máximo de 428nm e de emissão máximo de 536nm. A Cy5 possui um comprimento de onda de excitação máximo de 646nm e de emissão Figura 35 - Resultado da caracterização por microscopia confocal dos scaffolds termo-sensíveis. A vermelho a emissão de fluorescência do polímero, a verde a emissão de fluorescência das nanofibras e na imagem da direita Figura 36 - Imagens obtidas por microscopia confocal de laser com as nanofibras de policaprolactona desalinhadas (A) e alinhadas (C) marcadas por Cy5 e cobertas com polímero MEO₂MA-co-NAS marcado com Lucifer yellow. A e C) Imagens obtidas da emissão em simultâneo dos dois corantes em simultâneo. B e D) Gráficos com os resultados da caracterização por colocalização das imagens à esquerda, a parte interior das linhas a branco representam as sobreposições no mesmo pixel das duas emissões fluorescentes, fora das linhas encontram-se a emissões sem sobreposição...... 40 Figura 37 - Imagens obtidas por SEM com diferentes ampliações para caracterização da morfologia das nanofibras desalinhadas e alinhadas de policaprolactona cobertas com polímero MEO₂MA. A,B e C) Nanofibras de policaprolactona alinhadas com MEO₂MA a 45×45µm, 15×15µm e 5×5µm respectivamente. D, E e F) Nanofibras Figura 38 - Caracterização por AFM da alteração da superfície das nanofibras de policaprolactona cobertas com polímero MEO₂MA por estímulos térmicos (dimensão de cada imagem 2x2 µm). A) Imagens modo amplitude b) Figura 39 - Caracterização por SEM a 500×500µm e AFM da estrutura de um scaffold termo-degradável de Figura 40 - Caracterização da estabilidade e degradação do filme de 90%MEO₂MA/10%PCL por SEM. A) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 1 dia em água a 37°C a 95×95µm. B) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 4 dias em água a 37°C a 95×95µm. c) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 7 dias em água a 37°C a 95×95µm. D,E e F) Scaffold de 90%MEO2MA/10%PCL após 1 hora em água a 10°C a 140×140µm, a 140×140µm e 50x50µm respectivamente. G, H e I) Scaffold de 90%MEO2MA/10%PCL após 2 horas em água a 10°C a Figura 41 - Caracterização da superfície dos scaffolds termo-degradáveis de 75% MEO₂MA/25%PCL por SEM a diferentes ampliações e AFM. A) Superfície do scaffold de 75% MEO₂MA/25%PCL a 500×500µm. B) Superfície do scaffold de 75% MEO₂MA/25%PCL a 500x. C e D) Caracterização da superfície do scaffold por AFM pelo modo Figura 42 - Caracterização da estabilidade e degradação dos scaffolds de 75%MEO₂MA/25%PCL por SEM. a) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 1 dia em água a 37°C a 90×90µm. b) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 4 dias em água a 37°C a 90×90µm. c) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 7 dias em água a 37°C a 90x90µm. D,E e F) Scaffold de 75%MEO2MA/25%PCL após 1 hora em água a 10°C a 200x200µm,100x100µm e 50x50µm respectivamente. G,H e I) Scaffold de 75%MEO2MA/25%PCL após 2 horas em água a 10°C a Figura 43 - Scaffold de 50% MEO₂MA/50% PCL a 110×110µm. B) Scaffold de 50% MEO₂MA/50% PCL a 22×22µm. c) Scaffold de 50% MEO₂MA/50%PCL a 11×11µm. D,E e F) Caracterização da superfície do scaffold 50% Figura 44 - Caracterização da estabilidade e degradação dos scaffolds de 50%MEO₂MA/50%PCL por SEM. A) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 1 dia em água a 37°C a 18×18µm. B) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 4 dias em água a 37°C a 10×10μm. c) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 7 dias em água a 37°C a

4x4µm. D,E e F) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 1 hora em água a 10°C a 10x10µm, 10x10µm e 5x5µm respectivamente. G,H e I) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 2 horas em água a 10°C a 10×10µm, 10×10µm Figura 45 - Gráfico com o número de células contadas por Alamar blue nos scaffolds de nanofibras de policaprolactona termo-sensíveis desalinhados para os dias 7 e 9 nos meios de cultura DMEM+10%FBS a azul, Figura 46 - Caracterização de SEM dos scaffolds termo-sensíveis de nanofibras desalinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e ensaio de libertação de células. A,B,C,D,E,F) Scaffolds termosensíveis após 9 dias de cultura e ensaio de libertação de células a 21x21um, 42x42um, 50x50um, 42x42um. Figura 47 - Gráfico representativo da proliferação celular nos scaffolds termo-sensíveis de nanofibras alinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA durante 9 dias para os meios de cultura DMEM+10%FBS a azul, Figura 48 - Observação dos scaffolds termo-sensíveis de nanofibras desalinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e do ensaio de libertação de células pelo microscópio óptico. A e B) Scaffolds termo-sensíveis de nanofibras de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e ensaio de Figura 49 - Gráfico representativo da proliferação celular nos scaffolds termo-degradáveis de 75%MEO2MA /25%PCL durante 7 dias para os meios de cultura Xenofree a azul e DMEM+10%FBS a vermelho......53 Figura 50 - Gráficos do número de células num dado dia da cultura de células versus número de células libertado por temperatura nos scaffolds de 75%MEO₂MA/25%PCL em meio DMEM+10%FBS a azul e Xenofree a verde...54 Figura 51 - Gráfico da proliferação celular nos scaffolds termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL a azul. Figura 52 - Gráfico representativo da percentagem de libertação por temperatura vs libertação enzimática nos scaffolds de 75%MEO₂MA/25%PCL a azul, 90%MEO₂MA/10%PCL a verde e controlos com scaffolds de PCL a

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estratégias de cultura utilzadas para o estudo de proliferação, viabilidade e libertação celular porestímulos de temperatura.29

Lista de Abreviaturas

AFM	Microscópio de Força atómica
СТА	Agente de transferência de cadeia
Cy5	Molécula fluorescente Cianina 5
DMEM	Meio modificado de águia Dulbecco's
DMF	N,N-Dimetilformaldeído
DMSO	Dimetilsulfoxido
ECM	Matriz extracelular
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiamida hidrocloreto
FBS	Sérum bovino fetal
GAG	Glicosaminoglicanos
GPC	Cromatografia de permeação em gel
HFP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
LCST	Temperatura crítica de solução mínima
LSCM	Microscópio confocal de varrimento de laser
MEO2MA	2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato
MEO2MA-co-NAS	2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato-co-N-Acriloxisuccinimida
PCL	Policaprolactona
PNIPAm	Poli(N-isopropilacrilamida)
RGD	Arginina – Glicina – Ácido aspártico
RAFT	Transferência de Cadeia Reversível por Adição-Fragmentação
SEM	Microscópio electrónico de varrimento
UCST	Temperatura crítica de solução máxima

Capítulo 1- Introdução

1.1. Motivação

As células estaminais do mesenquima são células aderentes, tipicamente cultivadas em superfícies planas, em condições bastante diferentes do seu habitat *in-vivo*. No entanto o cultivo destas em superfícies planas pode induzir o comportamento das células do mesenquima, em termos do seu compromisso com determinadas linhagens ou indução/inibição de factores de crescimento produzidos. O uso de suportes poliméricos (*scaffolds*) no cultivo de células estaminais tem geralmente como objectivo em muitos estudos que seguem abordagens de engenharia de tecidos providenciar suporte físico para adesão e proliferação de células. No entanto, nesta tese, o uso de scaffolds construídos com nanofibras com diâmetros na escala das proteínas fibrosas, como colagénio I e II, tem como objectivo providenciar um microambiente com algumas semelhanças ao encontrado no nicho celular, de forma a promover uma multiplicação (expansão) da população celular menos comprometida pelo suporte usado. Após expansão das células é necessário recolher as células cultivadas.

Atualmente, na cultura de células e tecidos os métodos mais comuns para recuperação de células a partir de superfícies, como os *scaffolds*, são os enzimáticos e em muitos casos tem uma baixa eficácia de libertação nestes. Contudo, a utilização deste tipo de métodos danifica a membrana celular das células, enfraquecendo-as, podendo levar à morte das mesmas.

O uso de polímeros inteligentes são um desses casos, sendo possível usufruir das características específicas deste tipos de polímeros para o uso em *scaffolds*, com a intenção de libertar as células com recurso a estímulos físicos evitando a utilização de métodos enzimáticos.

1.2. Objectivos da tese

No contexto da motivação desta tese de mestrado, toma-se como objectivo principal a concepção de *scaffolds* de nanofibras sensíveis a estímulos de temperatura. Pretende-se que através da variação de temperatura do meio de cultura das células estaminais, estas fiquem em suspensão de modo a ser possível recuperá-las, evitando o uso de métodos enzimáticos. Será utilizado um polímero inteligente sensível à temperatura com base no monómero 2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO₂MA) que foi imobilizado em nanofibras de policaprolactona (PCL) de modo a produzir *scaffolds* termo-sensíveis. Os *scaffolds* produzidos serão caracterizados e será estudada a proliferação de células mesenquimais em cultura e a taxa de libertação conseguida recorrendo a estímulos de temperatura. Outro objectivo da tese centra-se na produção por *electrospinning* de fibras termo-degradáveis, a partir de uma mistura entre o polímero MEO₂MA e a policaprolactona, que serão igualmente caracterizadas.

1.3. Estrutura da tese

Esta tese está estruturada da seguinte forma: o capítulo 2 apresenta o estado da arte que inclui uma introdução às células estaminais, aos biomateriais e *scaffolds* utilizados em células estaminais, ao *electrospinning* e aos polímeros inteligentes; no capítulo 3 são apresentados os materiais e métodos usados utilizados, que inclui os métodos utilizados para a síntese dos materiais, a produção dos *scaffolds* e a caracterização dos mesmos; no capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos, sendo apresentados primeiro os resultados da caracterização dos *scaffolds* de nanofibras termosensíveis e termo-degradáveis produzidos, e de seguida os resultados relativamente à cultura de células mesenquimais nos *scaffolds* produzidos e a discussão dos mesmos; por último são apresentadas as conclusões desta tese de mestrado relativamente a todo o trabalho efectuado.

Capítulo 2 – Estado da arte

2.1. Células estaminais

As células estaminais são células indiferenciadas que possuem a capacidade de originar diferentes tipos de células por diferenciação. Estas células são responsáveis pelo crescimento e manutenção dos tecidos celulares dos organismos, reparando os tecidos por um processo denominado auto-renovação. Neste processo, as células estaminais dividem-se, originando células idênticas a elas próprias e outras que se diferenciam num determinado tipo de tecido celular (figura 1).^{1, 2, 3}



Figura 1 – Diferenciação em diferentes tipos de células a partir de uma célula estaminal mesenquimal.⁴

O potencial de diferenciação de uma célula estaminal é classificado de acordo com o número de diferentes tipos de células que originam por diferenciação celular, sendo classificadas como totipotentes quando possuem a capacidade de originar todos os tipos de células de um organismo, pluripotentes quando possuem a capacidade de formar a maioria dos tecidos de um organismo com

excepção dos tecidos da placenta e multipotentes (células mesenquimais) quando possuem a habilidade de formar todas as células de um tecido celular específico. ^{1, 2, 3}

2.1.1. Tipos de células estaminais

As células estaminais podem ser encontradas e colhidas em diferentes tecidos de um organismo. A fonte de células estaminais totipotentes é o ovo fertilizado através de fertilização *in vitro* com quatro dias de maturação. As células recolhidas a partir desta fonte possuem a capacidade de diferenciar-se nas três linhas germinais (Endoderme, Ectoderme e Mesoderme) e nos tecidos reprodutores (células germinais) ilustrados na figura 2.^{1, 2, 3, 4}



Figura 2- Caminhos de diferenciação das células estaminais. 4

A fonte de células pluripotentes reside na massa interna do blastocisto de um ovo fertilizado com mais de quatro dias de vida, sendo que as células recolhidas a partir desta fonte possuem a capacidade de diferenciar-se apenas na Endoderme, Ectoderme e Mesoderme, não possuindo a capacidade de se diferenciar nos tecidos reprodutores.^{1, 2, 3, 4}

As células estaminais multipotentes podem ser encontradas em mais fontes do que os anteriores tipos de células estaminais, e devido à sua maior abundância no corpo humano são mais utilizadas em terapias e investigação. Este tipo de células estaminais pode ser encontrado em vários tecidos de um organismo sendo as principais fontes a medula óssea e o cordão umbilical. As células recolhidas a partir destas fontes apenas possuem a capacidade de dar origem à maior parte das células de um tecido ou órgão e realizar auto-renovação.^{1, 2, 3, 4}

2.1.2. Classificação das células estaminais

As células estaminais podem ser obtidas de diferentes tecidos. As células estaminais humanas embrionárias e fetais são recolhidas a partir do blastocisto de um ovo fertilizado e tecidos fetais, respectivamente. Células estaminais adultas são recolhidas a partir de tecidos do paciente/dador. As células estaminais adultas são classificadas de acordo com o tipo de células a partir do qual estas foram colhidas ou pelo tecido diferenciado em que elas se desenvolvem (figura 3). ^{1, 2, 3, 4, 5}



Figura 3 – Principais fontes de células estaminais do corpo humano.⁵

As células estaminais hematopoiéticas podem ser colhidas através da medula óssea, sangue periférico ou sangue do cordão umbilical e possuem a capacidade de se diferenciar nas várias linhas do sangue (figura 3), sendo o tipo de células estaminais mais conhecido e utilizado em terapias celulares.^{1,2,3,4,5}

As células estaminais mesenquimais podem ser colhidas da medula óssea, da matriz do cordão umbilical e do tecido adiposo de um adulto (figura 3). Possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células do tecido conjuntivo e a capacidade de promover a angiogénese.^{1,2,3,4,5}

2.1.3. Matriz extracelular (ECM)

A matriz extracelular é uma componente dos tecidos que oferece superfície para as células estaminais aderirem, migrarem e proliferarem. A matriz extracelular fornece suporte físico, nutrientes e moléculas importantes para a sobrevivência das células, desempenhando um papel importante na promoção da diferenciação celular de células estaminais em tipos específicos de tecidos ou células especializadas.^{1,6,7,8}

A matriz extracelular (figura 4-A) é composta principalmente por células endoteliais, fibroblastos, adipócitos e proteínas estruturais nomeadamente colagénio do tipo I, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurónico e a elastina. ^{1,6,7,8} Além das moléculas estruturais que compõem a matriz extracelular, as células estaminais necessitam de moléculas adicionais para induzirem a diferenciação celular num tipo de célula especializada ou formarem um tecido. Estas moléculas são conhecidas como factores de crescimento, citoquinas e percursores de receptores de membrana que possuem o papel de mediar a adesão celular, a migração e a função dos tecidos presentes na matriz extracelular (figura 4-B). ^{1,6,7,8,82}



Figura 4 - A) Composição e arquitectura da matriz extracelular. B) Ambiente e interações das células estaminais com os scaffolds.^{8,82}

A matriz extracelular oferece aos tecidos alguma flexibilidade, sendo esta característica dos tecidos providenciados por fibras elásticas que permitem que a matriz expanda e contraia em resposta a forças aplicadas, de modo a não perder a sua forma inicial. As moléculas que constituem maioritariamente estas fibras elásticas é a elastina, que possui como função de armazenamento de energia e reticulação com as microfibrilas que fazem a mediação da sinalização celular na matriz. 1,6,7,8

2.1.4. Cultura de células estaminais

Devido ao número limitado de células estaminais que podem ser recolhidas no corpo humano e a grande procura para tratamentos clínicos e para investigação, a necessidade de expansão de células estaminais aumentou. Para resolver este problema, os métodos de cultivo de células e algumas tecnologias de ponta foram desenvolvidas, para permitir a expansão de células estaminais e resolver a limitada capacidade de proliferação deste tipo de células.^{1, 2, 3}

Para obter uma grande quantidade de células estaminais a partir de uma quantidade inferior, estas necessitam de ser cultivadas em meios de cultura adequados com factores de crescimento celular, e uma superfície de adesão que mimetize a matriz extracelular do tipo de células a expandir. Quando estas condições se verificam, as células possuem a capacidade de aderir e gerar mais células iguais a si próprias. O principal obstáculo da expansão de células estaminais é o controlo da diferenciação durante a cultura celular e a obtenção de um número de células relevante para o uso destas células em testes clínicos.^{1, 2, 3}

O meio de cultura para expansão necessita de renovação constante dos factores de crescimento específicos, nutrientes, oxigénio e dióxido de carbono em concentrações específicas, temperatura controlada e superfícies de adesão onde as células poderão crescer.^{1, 2, 3}

As células estaminais e alguns tecidos são normalmente cultivados em frascos ou placas próprias para cultura, denominando-se métodos de cultura estáticos (figura 5), sendo fáceis de usar e os mais indicados para realizar investigação com células estaminais. No entanto, possuem algumas limitações quanto ao número de células que suportam devido à área de superfície disponível, à fraca difusão de gases e baixo controlo do pH da cultura. ^{1, 2, 3}



Figura 5 – Principais suportes de cultura estáticos. A) Placas de poços de poliestireno. B) Frascos de poliestireno. C) Placas de Petri de poliestireno.⁹

Com a utilização de bioreactores, método de cultura dinâmico (figura 6), são ultrapassados alguns dos problemas dos métodos de cultura estáticos, como a limitação do transporte de nutrientes e metabolitos, difusão de oxigénio e controlo do pH. Estes métodos possuem um rendimento mais

elevado ao nível do número de células obtidas no final da cultura, sendo utilizados para expansão de células estaminais em terapias celulares.^{1, 2, 3}



Figura 6 – Métodos de cultura dinâmicos. A) Frasco de rotação. B) Bioreactor de ondulação.^{10,11}

O cultivo de células estaminais aderentes em reactores de tanque agitado requer o uso de microcarriers de forma a providenciar superfície de adesão para o crescimento das células. Assim como no caso do uso de placas de cultura, após a cultura de células estaminais em microcarriers, é realizada a recuperação das células da superfície. Para tal, são usadas enzimas proteolíticas como a tripsina, acutase ou a mistura de várias enzimas para a libertação das células estaminais ou de tecidos das superfícies nas quais aderiram e cresceram. A dissociação das células estaminais da superfície dos materiais onde cresceram com recurso a enzimas proteolíticas danifica a membrana das células (como os receptores de proteínas e conexões entre as células estaminais), tornando-as mais fracas, aumentando a susceptibilidade de morte após libertação e induz o aparecimento de cicatrizes nos tecidos recolhidos.^{12,13,14,15}

2.2. Biomateriais para células estaminais

A aplicação de materiais usados noutras áreas projectou o avanço da engenharia de tecidos e medicina regenerativa num campo interdisciplinar. Actualmente, métodos e materiais de engenharia, biologia, medicina e ciências dos materiais são encontrados em diversas ferramentas como os *scaffolds*, utilizados para mimetizar o microambiente *in vivo* e manter a função dos tecidos para investigação ou aplicação clinica. ^{1,2,8}

Os scaffolds foram desenvolvidos com a função de mimetizar a estrutura da matriz extracelular, oferecendo uma superfície tridimensional onde as células estaminais podem aderir, crescer ou formar tecidos (figura 7). As estratégias comuns de utilização de *scaffolds* envolvem o cultivo de células estaminais nestas plataformas para adaptação após expansão em superfícies bidimensionais numa superfície tridimensional. Posteriormente à adaptação após expansão numa superfície tridimensional as células estaminais são recolhidas por tratamento enzimático e cultivadas de novo num *scaffold* para que cresçam e diferenciem em tecidos especializados. Assim sendo é essencial que as células estaminais realizem esta adaptação inicial aos *scaffolds* para que percam o perfil de expansão e consigam posteriormente se diferenciar em células especializadas e formarem tecidos.^{1,2,3,12-17}



Figura 7 - Estratégia de cultura de scaffolds em engenharia de células e tecidos.8

Os *scaffolds* actuam como uma estrutura temporária para o crescimento de células e diferenciação, estes devem ser desenhados e desenvolvidos de modo a que as células estaminais sejam capazes de difundir factores de crescimento, moléculas de adesão, promover as interacções celulares e apresentarem propriedades físicas como flexibilidade, dureza ou resistência do material para a formação de tecidos e implantação *in-vivo* (figura 7). ^{1,2,3,12-17}

A biocompatibilidade e degradação dos materiais que constituem os *scaffolds* são um dos principais aspectos a cumprir durante o seu desenvolvimento. Estes não deverão formar moléculas ou compostos reactivos quando em contacto com fluidos biológicos. A porosidade e a interconexão dos poros dos *scaffolds* permitem às células as essenciais interações entre elas e uma boa difusão de moléculas necessárias ao suporte e crescimento das mesmas.^{1,2,3}

A funcionalização dos *scaffolds* com outras moléculas ou a simples alteração do tipo de superfície do material é um passo importante no desenvolvimento destes, permitindo o aumento da biocompatibilidade da superfície dos mesmos. Os processos de funcionalização dos materiais resultaram num grande avanço na engenharia de células e tecidos, uma vez que tornou possível incluir nos materiais factores biológicos responsáveis pela adesão e/ou diferenciação de células, bem como remodelação do scaffold por acção de metaloproteases produzidas pelas células. As propriedades físicas dos materiais deverão ser cuidadosamente estudadas, uma vez que influenciam directamente o processo de adesão celular na superfície do *scaffold*, sendo estas propriedades conhecidas como a hidrofobicidade, polaridade, dureza, rugosidade e composição química do material. ^{1,2,3,12-17}

2.2.1. Tipos de biomateriais em engenharia de células e tecidos

Na engenharia de células e tecidos são utilizados maioritariamente polímeros para a produção de suportes de crescimento, podendo estes ser de origem natural ou de origem sintética. Os

polímeros naturais mais usados nesta área são o dextrano, o alginato, a gelatina, a celulose, o quitosano, o ácido hialurónico, o colagénio, entre outros, tendo sido referenciados ou utilizados como materiais que poderão ser utilizados como mimetizadores da matriz extracelular e consequentemente como suportes de crescimento para células.^{1,2,19}

A vantagem da utilização dos polímeros naturais vem do facto destes serem de origem biológica, o que aumenta a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, a sua abundância destes na natureza e a presença de grupos laterais que facilitam a adesão e o crescimento celular. Por outro lado, o uso destes polímeros trazem algumas desvantagens, como o seu difícil processamento, a baixa tensão superficial, a difícil modificação das suas propriedades mecânicas, o *cross-linking* com outros materiais por ligações químicas e o difícil controlo do seu peso molecular.^{1,2,19}

Para ultrapassar estas dificuldades, foram adaptados alguns polímeros sintéticos já utilizados noutras áreas, e sintetizados novos polímeros que conseguissem responder a todas as exigências requeridas, sendo que cada tipo de célula ou tecido necessita de materiais com características diferentes para se poder sustentar.^{18,19}

A introdução dos polímeros sintéticos na engenharia de células e tecidos levou a um grande avanço nesta área, uma vez que era possível sintetizar estes polímeros ou modificá-los quimicamente, de modo a ser possível responder às exigências requeridas para determinadas aplicações. Os polímeros sintéticos mais referenciados e utilizados nesta área são a policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), poli(D,L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(L-ácido láctico) (PLLA), poliuretano (PU), o poliestireno (PS).^{18,19}

A vantagem de utilizar os polímeros sintéticos para substituir os naturais deve-se ao fácil controlo do peso molecular destes, ao fácil controlo da sua hidrofobicidade, à fácil alteração das suas propriedades mecânicas e à fácil reprodutibilidade. Entretanto algumas desvantagens e problemas estão associados ao uso dos polímeros sintéticos, como a sua difícil interação com as células na promoção da adesão celular, à difícil estabilidade destes em diferentes parâmetros de cultura e no controlo da velocidade de degradação destes materiais e consequente toxicidade para as células.^{1,2,18,19}

2.2.2. Policaprolactona (PCL)

A policaprolactona é um poliéster composto por uma cadeia de carbonos e grupos representado na figura 8. A biodegradabilidade da policaprolactona é influenciada pela velocidade de hidrólise da ligação éster em condições fisiológicas, sendo os produtos desta reacção compostos por ácido carboxílico, que são facilmente excretados e metabolizados pelo corpo humano.^{20,21}



Figura 8 - Estrutura da policaprolactona.

A vantagem de utilizar este polímero em detrimento de outros na engenharia de tecidos vem da baixa velocidade de degradação deste (biodegradabilidade), da biocompatibilidade dos seus produtos de reacção, fácil preparação, fácil modificação das suas propriedades mecânicas e baixo. No entanto à que ter em conta o seu grau de hidrofobicidade para aplicação como suporte para crescimento celular.^{20,21}

Actualmente a policaprolactona possui múltiplas aplicações como *scaffold* para uso em engenharia de tecidos. Adicionalmente este polímero foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) pelo seu potencial em aplicações biomédicas e aplicações de entrega de fármacos.^{20,21}

2.2.3. Características dos scaffolds

Na avaliação dos *scaffolds* algumas exigências deverão ser comprovadas em relação aos biomateriais utilizados e quanto à sua estrutura, para que estes possam ser utilizados em aplicações de engenharia de células e tecidos. As principais características de um *scaffold* estão na composição do biomaterial, na porosidade, na arquitectura, nas propriedades mecânicas, no transporte de massa e no grau de degradação.

A composição do material deve favorecer o crescimento celular, a viabilidade celular e adequação para implantação *in-vivo*. A porosidade deve ser elevada de forma a favorecer a vascularização, a migração e diferenciação celular. A arquitetura (interconectividade, tamanho do poro e geometria) do *scaffold* deve permitir o crescimento de tecidos e o controlo da morfologia do novo tecido. As propriedades mecânicas devem ser estudadas para que o *scaffold* consiga suportar cargas mecânicas sem deformação durante a implantação *in-vivo*. A arquitectura do scaffold deve favorecer a difusão de nutrientes e moléculas essenciais no scaffold para que as células consigam crescer. A velocidade de degradação dos *scaffolds* deve permitir que exista crescimento de tecidos e remodelação da matriz extracelular sem perca das características iniciais do *scaffold*, pois a perca da estrutura do *scaffold* por degradação induz a perca de funcionalidade dos tecidos e resultante morte celular.^{1,2,22,25}

Outros parâmetros deverão ser tidos em conta como o tipo de células que se vão utilizar, uma vez que estas necessitam de diferentes requisitos em relação à estrutura do *scaffold*, para que estas consigam formar tecidos. A rugosidade e a elasticidade do material são factores de diferenciação e proliferação celular, uma vez que as células não conseguem formar tecidos em suportes planos com elevada rigidez. ^{1,2,22,25}

Na utilização de *scaffolds* de nanofibras tem sido referenciado que estes favorecem o crescimento celular de diferentes tipos de células e a posterior diferenciação. Dado que o diâmetro das nanofibras será inferior ao das células, estas ao alongarem-se em torno das fibras conseguem organizar-se entre si de maneira a formar a matriz extracelular ao longo do *scaffold* e posteriormente formar os tecidos.^{25,26,27,28,29}

2.2.4. Scaffolds para engenharia de células e tecidos

Actualmente existem vários tipos de *scaffolds* na área da engenharia de células e tecidos, sendo que para cada tipo de tecido existe um scaffold característico. Os mais conhecidos ou mais utilizados

são os *scaffolds* para tecido ósseo e os *scaffolds* fibrosos que são adequados a diferentes tipos de tecidos moles como músculo, nervos, cartilagem.

Na construção de *scaffolds* para uso com células estaminais é necessário saber qual o tipo de biomaterial e estrutura mais adequado ao estudo pretendido, sendo que a combinação destes factores é determinante para se obter uma correcta formação do tecido celular.

Quando se pretende diferenciar células do tecido ósseo é necessário que o scaffold tenha uma estrutura tridimensional muito porosa e rígida, de forma a mimetizar e induzir a diferenciação das células estaminais em células especializadas do osso como é o caso dos osteoblastos. Quando se pretende diferenciar células de tecidos moles, é necessário uma estrutura tridimensional menos rígida, uma vez que este tipo de tecido desenvolve-se por camadas, sendo necessário que estes tipos de *scaffolds* possuam uma razão de área superficial por volume elevado para permitir a diferenciação dos tecidos.^{22,25-29,31}

Actualmente, existem inúmeras técnicas para produzir *scaffolds* em engenharia de células estaminais, sendo que muitas foram adaptadas para esta área, proporcionando um rápido desenvolvimento de soluções. Como técnicas para produção de *scaffolds* pode-se referir o *electrospinning* que permite a produção de *scaffolds* fibrosos com diâmetros que poderão ir até às dezenas de nanómetros. Em alternativa, existem as técnicas tridimensionais que podem ser aditivas ou subtrativas, obtendo-se *scaffolds* de melhor qualidade por técnicas aditivas como o caso das impressoras tridimensionais. As extrusoras são actualmente uma das técnicas mais utilizadas para produzir *scaffolds*, uma vez que permite a construção destes a partir de *softwares* de desenho, com o material e as dimensões desejadas. Esta técnica permite o controlo exacto de diferentes parâmetros de construção de *scaffolds*, não necessita de solventes e é totalmente automatizado, ao contrário do *electrospinning* onde o diâmetro das fibras produzidas e a sua morfologia são parâmetros muito difíceis de controlar, afectando a reprodutibilidade entre *scaffolds*.^{2,3}

2.2.5. Funcionalização de *scaffolds* para uso em engenharia de células e tecidos

A funcionalização dos biomateriais sintéticos é um dos passos determinantes para que estes possam ser usados em aplicações de engenharia de células e tecidos. Uma vez que muitos destes materiais não eram susceptíveis para uso em células devido à sua baixa biocompatibilidade ou por não permitirem uma boa adesão celular tornou-se evidente ser necessário encontrar uma alternativa, sendo que algumas das propriedades que este tipo de materiais ofereciam, poderiam ser factores determinantes para o desenvolvimento de algumas aplicações nesta área.^{2,12,17,22,24,32}

Por modificação de superfícies foi possível introduzir grupos orgânicos, moléculas químicas e biológicas na superfície destes biomateriais que possibilitaram o seu reconhecimento celular e consequente a adesão a estes por parte das células estaminais. Permitiu assim controlar o comportamento celular e combinar as características únicas que estes biomateriais sintéticos ofereciam para a construção de *scaffolds*.^{2,32}

Para o reconhecimento celular de *scaffolds* é necessário que estes possuam na sua superfície moléculas sinalizadoras, tais como moléculas constituintes da matriz extracelular

(glicosaminoglicanos, proteoglicanos, citosinas) e proteínas de adesão como é o caso da sequência de péptidos (arginina-glicina-ácido aspártico) mais conhecido como RGD. Por outro lado, a simples introdução de grupos OH ou NH₂ na superfície dos biomateriais permite um aumento do reconhecimento celular, uma vez que torna a superfície desses biomateriais menos hidrofóbica e mais susceptível de as células aderirem.^{2,32,35}

O controlo da funcionalização da superfície dos biomateriais e as interações entre o substrato e as células ainda constituem alguns problemas, uma vez que a sua compreensão está além do material, mas sim das células que possuem diferentes metabolismos e actividades biológicas que estas demonstram.^{2,32,35}

Existem diferentes metodologias para modificar a superfície destes biomateriais como é o caso da modificação por plasma, oxidação de ozono, hidrólise alcalina ou por modificação química. Neste trabalho irão ser introduzidas na superfície das nanofibras de policaprolactona grupos de amina (NH₂) por tratamento de aminólise, que irão permitir a ligação de um polímero com resposta termo-sensível para avaliação da libertação celular.

2.3. Electrospinning

As nanofibras foram recentemente implementadas como estratégia de investigação para engenharia de tecidos na construção de *scaffolds* de nanofibras para expansão e diferenciação de células estaminais. As principais vantagens do uso de *scaffolds* de nanofibras no crescimento de células estaminais são a grande área de superfície em relação ao volume do scaffold, a porosidade, as propriedades mecânicas e a fácil produção e funcionalização destes mesmos *scaffolds*.^{2,3,16}

O método mais utilizado na produção de nanofibras é o *electrospinning* através do qual é possível obter diâmetros e geometrias variáveis de fibras com diferentes materiais.

Esta técnica consegue produzir nanofibras com grande reprodutibilidade através de um equipamento simples de baixo custo (figura 9).^{22,26,27,28,30}



Figura 9 – Principais componentes e montagem do electrospinning de placas paralelas.³⁶

2.3.1. Princípio de funcionamento do electrospinning

Um equipamento básico de *electrospinning* é constituído por uma seringa, uma agulha, uma fonte de tensão, uma bomba de seringas e um colector. A bomba de seringas regula o fluxo de solução até à agulha através de um tubo capilar, a aplicação de uma diferença de potencial entre os

10kV e os 30kV, cria um campo eléctrico que induz a solução de polímero a ser projectada para o colector. ^{22,26,27,28,30}

As fibras começam a ser formadas quando na extremidade da agulha se forma uma gota de solução em forma de cone, sendo este fenómeno conhecido como cone de *Taylor*. Este fenómeno significa que as forças electrostáticas repulsivas sobrepuseram-se à tensão superficial do polímero em solução, formando um jacto contínuo de fibras na direcção do colector. Este jacto possui duas fases, uma ohmica e uma convectiva (figura 10). O solvente na qual o polímero está dissolvido evapora durante o processo de formação da fibra, sendo que esta deposita-se no colector já seca. 22,26,27,28,30



Figura 10 – Principio físico da formação de fibras por *electrospinning*.⁷⁶

2.3.2. Parâmetros de funcionamento do electrospinning

De acordo com o tamanho das fibras e matrizes que se pretende produzir por *electrospinning*, deverão ser estudados e controlados alguns parâmetros que influenciam directamente a fibras produzidas. Os parâmetros que influenciam a formação de fibras por *electrospinning* são as propriedades da solução de polímero (viscosidade, condutividade, tensão superficial e peso molecular do polímero), os parâmetros de processo (caudal, potencial eléctrico, distância para o colector, tipo de agulha, composição e geometria do colector) e as condições ambiente (temperatura e humidade).^{4,}

A condutividade da solução é influenciada pelo solvente onde o polímero se encontra dissolvido, uma vez que o polímero necessita de ser solúvel no solvente utilizado e o mesmo deve ser um bom condutor de cargas eléctricas de forma a ser possível produzir nanofibras.^{26,27,28,30,36,38}

Os parâmetros de processo são os factores críticos para o controlo dos scaffolds produzidos por electrospinning relativamente a obtenção de nanofibras reprodutíveis em relação ao diâmetro e morfologia.^{26,27,28,30,36,38}

O potencial eléctrico aplicado entre a extremidade da agulha e o colector deverá situar-se nos quilovolts para ser possível formar o campo eléctrico e o cone de *Taylor*, sendo que o potencial utilizado influencia directamente o diâmetro das fibras produzidas e a uniformidade de deposição das mesmas.^{26,27,28,30,36,38}

A viscosidade da solução influenciam o diâmetro das fibras produzidas, tendo em conta que tem um efeito na tensão superficial gerada na extremidade de agulha.^{26,27,28,30,36,38}

A distância entre a agulha e o colector influencia o campo eléctrico produzido e a dispersão das fibras à chegada ao colector, influenciando a deposição das fibras e a resultante morfologia do *scaffold*. ^{26,27,28,30,36,38}

A geometria do colector influencia a orientação da deposição das fibras e consequentemente o tipo de campo eléctrico formado. O material condutor que constitui o colector influencia a transferência de cargas da agulha para o colector e consequente intensidade do campo eléctrico. 26,27,28,30,36,38

O ambiente onde são produzidas as fibras influencia a morfologia, o diâmetro e a sua porosidade. A humidade é um dos aspectos críticos a ter em conta e não deve ultrapassar os 35%, uma vez que afecta a o diâmetro e morfologia das mesmas, por não secarem eficientemente antes da deposição. Humidades elevadas causam dispersão do campo eléctrico e consequente alteração na orientação de deposição das fibras.^{26,27,28,30,36,38}

2.3.3. Tipos de colector

O colector é uma das peças mais importantes do *electrospinning*, uma vez que são aqui depositadas as fibras que são formadas na extremidade da agulha. A geometria do colector influencia o campo eléctrico formado pelo *electrospinning* para os colectores na figura 11-B,C e D, para o colector rotativo a deposição das fibras é influenciada pela velocidade de rotação do tambor. Assim sendo a partir de diferentes colectores é possível obter diferentes resultados relativamente à orientação das fibras.^{26,27,28,30,36,38,77}

Actualmente existe uma grande variedade de colectores para *electrospinning* (figura 11), como placas circulares de cobre, anéis circulares de alumínio, placas paralelas de cobre ou alumínio e tambores rotativos de cobre ou alumínio. Cada um deste tipo de colectores permite colectar fibras com diferentes orientações e propriedades. ^{26,27,36,39,76}



Figura 11 – Principais colectores para *electrospinning*: A) Colector rotativo; B) Placa de metal; C) Placas paralelas de metal; D) Colector em anel.

Quando se pretende obter fibras com uma orientação alinhada, ou seja, o ângulo que estas fazem entre si é inferior a 30°, utilizam-se placas circulares paralelas ou tambores rotativos, sendo que o comprimento das fibras produzidas depende do espaço entre as placas ou do perímetro do tambor. Por outro lado, quando se pretende obter fibras com uma orientação desalinhada são usadas placas circulares de cobre ou alumínio.^{26,27,36,39,76}

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de colectores para produzir nanofibras alinhadas e desalinhadas, tendo sido utilizado um colector que consiste em duas placas de alumínio paralelas e

com um espaço predefinido entre si para formar e colectar as nanofibras alinhadas e uma placa circular de cobre para produzir e colectar nanofibras desalinhadas.

2.3.4. Scaffolds de nanofibras

As nanofibras foram recentemente implementadas na engenharia de tecidas como *scaffolds* padrão para o crescimento e diferenciação de células e tecidos, recriando o microambiente destas. A composição e a arquitetura dos *scaffolds* são factores determinantes na adesão das células e para a formação de tecido.^{16,19,22,25,28}

O objectivo dos *scaffolds* de nanofibras é recriar o microambiente das células estaminais, promover o crescimento celular e de tecido *ex-vivo*, para posterior implantação *in-vivo*. Mas para que este processo seja aplicável em engenharia de tecidos, é necessário que o *scaffold* cumpra alguns requisitos. Os requisitos que os *scaffolds* devem cumprir são a biocompatibilidade do material que os constitui, devem promover a adesão celular de modo a existir crescimento e diferenciação, devem manter a orientação tridimensional da sua estrutura ao longo do processo de crescimento, devem obedecer às configurações de tamanho e forma do tecido que se pretende desenvolver e por último o material que o constitui deve ser biodegradável *in-vivo* de forma a incorporar o tecido e desaparecer. 16,19,22,25,28

Os *scaffolds* de nanofibras devem ser constituídos por fibras de diâmetro inferior a 500 nm, de forma a mimetizar a estrutura da matriz extracelular da célula, ou seja estas nanofibras deverão ser sempre uma a duas vezes inferiores ao tamanho das células que se pretende cultivar, de modo a permitir o contacto directo entre estas ao longo de várias fibras que compõem o *scaffold* e definir a conformação tridimensional do tecido. ^{16,19,22,25,28}

Para produzir *scaffolds* de fibras de diâmetro inferior a 500 nm são conhecidas duas técnicas: a separação de fases e o *electrospinning*. A técnica de separação de fases foi pioneira na produção de scaffolds de nanofibras com diâmetros inferiores a 500 nm com arquiteturas macroporosas ajustáveis, usando poliésteres alifáticos biodegradáveis. Esta técnica tem como princípio a separação termodinâmica de uma solução de polímero numa fase rica em polímero e outra rica em solvente, sendo que a separação pode ser induzida termicamente ou pela adição de um não solvente que induz a precipitação do polímero em forma de gel. Após este processo, o solvente é retirado e o gel é arrefecido atá à temperatura de transição vítrea do polímero e liofilizada em vácuo para produzir o scaffold fibroso. Por outro lado, o *electrospinning* já descrito nos capítulos anteriores revolucionou a forma de produzir nanofibras, por ser um método mais simples de implementar comparado com a técnica de separação de fases e permitir o uso da maioria dos polímeros conhecidos. ^{16,19,22,25,28}

2.4. Polímeros inteligentes

Os polímeros inteligentes possuem a capacidade de alterar a sua conformação de cadeia em solução a partir de um estímulo físico, químico ou biológico e voltar à sua conformação inicial quando são repostas as condições iniciais. Estes polímeros conseguem responder a um estímulo alterando a sua estrutura secundária pelo balanço hidrofílico e hidrofóbico, a sua solubilidade em solução e pela sua associação intermolecular que pode originar a degradação e clivagem de cadeias.^{46,47}

A principal diferença dos polímeros inteligentes em relação aos polímeros que não respondem a estímulos, reside nas múltiplas interações cooperativas que existem entre os seus monómeros, tais como a ionização ou a perda de ligações de hidrogénio progressivas que provocam uma alteração estrutural ou a destruição das cadeias destes polímeros.^{46,47}

O comportamento demonstrado por parte dos polímeros inteligentes levou à sua aplicação em diversas áreas, sendo as áreas da engenharia e da medicina onde despoletou maior interesse e actualmente existem inúmeras aplicações à nanoescala como os dispositivos microfluídicos, libertação controlada de fármacos, bioadesão e actuadores.^{46,47}

Actualmente os polímeros inteligentes mais estudados e desenvolvidos são os sensíveis à temperatura, pH e luz.^{46,47}

2.4.1. Tipos de polímeros inteligentes

Os polímeros inteligentes são classificados de acordo com o estímulo que lhe causa as modificações de cadeia. Actualmente existem diversos polímeros que respondem a diferentes estímulos. Estes polímeros inteligentes (figura 12) conseguem responder a estímulos físicos (temperatura, luz, ultra-sons, campo-magnético, campo eléctrico e mecânico), estímulos químicos (pH e força iónica) e estímulos biológicos (enzimas, proteínas e nutrientes). ^{46,47,76}



Figura 12 – Principais estímulos de resposta dos polímeros inteligentes.⁷⁶

Os polímeros inteligentes sensíveis a gradientes de pH possuem grupos funcionais na cadeia que ionizam quando o pH da solução está próximo do pKa. A ionização deste grupo funcional modifica a permeabilidade da água nas cadeias do polímero, levando a variações do volume hidrodinâmico deste e como consequência induz a dilatação de um gel de polímero. A aplicação mais conhecida dos polímeros sensíveis a pH encontra-se na incorporação e entrega de agentes bioactivos através dos gradientes de pH existentes no nosso organismo. Os polímeros mais conhecidos que respondem a estímulos de pH são os poli(ácido acrílico) (PAA) e a poli(lisina).^{46,47,76}

Os polímeros electro-sensíveis possuem a habilidade de expandir, contrair ou torcer em resposta a campos eléctricos. Estes polímeros inteligentes possuem surfactantes carregados incorporados nas suas cadeias, como o politiofeno (PT) ou poliestireno-sulfonado (PSS) que quando expostos a campos eléctricos variáveis alteram o seu volume hidrodinâmico. Algumas aplicações deste tipo de polímero encontram-se na incorporação e entrega de agentes bioactivos pela aplicação de campos eléctricos. ^{46,47,76}

Os polímeros bio-sensíveis possuem a habilidade de reconhecer e responder a compostos biológicos como a glucose, enzimas, proteínas ou metabolitos. Este tipo de polímeros possui biomoléculas como proteínas ou anticorpos incorporados nas cadeias, que na presença de moléculas específicas ou iões específicos, levam a alterações do volume hidrodinâmico do gel.^{46,47,76}

Os polímeros sensíveis à luz na gama do visível possuem a habilidade de alterar o seu volume hidrodinâmico quando expostos a comprimentos de onda do gama do visível específicos, devido à presença de moléculas fotoactivas. Estes polímeros inteligentes trazem grandes vantagens para aplicações em engenharia de células e tecidos, uma vez que a luz ou os lasers podem ser aplicados com alguma facilidade em locais superficiais do corpo humano.^{46,47,76}

Os polímeros termo-sensíveis são os mais estudados e utilizados, sendo usado maioritariamente em aplicações de modificação de superfície e entrega de fármacos. Os polímeros que apresentam respostas a gradientes de temperatura são caracterizados por temperaturas críticas de solução mínima (LCST), que definem a temperatura para a qual as cadeias de polímero começam a contrair em solução ou a temperatura para a qual é modificada a superfície coberta pelo polímero termo-sensível.^{14,15,17,46,47,52,76}

A contracção ou expansão das cadeias deve-se à disrupção ou formação com a temperatura de interações electrostáticas intramoleculares e à mudança das interações hidrofóbicas entre os monómeros. A contração e a expansão das cadeias são caracterizadas pelo volume de transição de fase da solução de polímero, sendo os diagramas de fase de temperatura dos polímeros essencial para perceber esse comportamento. ^{14,15,17,46,47,52,76}

Nos diagramas de fase de temperatura (figura 13), estão representadas duas temperaturas de solução crítica de um polímero termo-sensível, onde pode observar-se a temperatura crítica de solução máxima (UCST) e a temperatura crítica de solução mínima (LCST). Para o diagrama de fases de um polímero termo-sensível com uma LCST, as cadeias do polímero encontram-se expandidas quando para uma dada composição da mistura a temperatura do meio se encontra abaixo da temperatura de transição de fase do polímero (LCST) e contraídas acima dessa temperatura de transição. Para o diagrama de fases de um polímero termo-sensível com UCST, as cadeias do polímero encontram-se expandidas quando para uma dada composição da mistura a temperatura de transição. Para o diagrama de fases de um polímero termo-sensível com UCST, as cadeias do polímero encontram-se expandidas quando para uma dada composição da mistura a temperatura de transição. Para o diagrama de fases de um polímero termo-sensível com UCST, as cadeias do polímero encontram-se expandidas quando para uma dada composição da mistura a temperatura do meio se encontra acima da temperatura de transição de fase do polímero (UCST) e contraídas abaixo dessa temperatura de transição.



Figura 13 – Diagrama de fases de Temperatura vs Composição de fases de um polímero termo-sensível.⁴⁸

O polímero termo-sensível mais conhecido e caracterizado é o poli(N-isopropilacrilamida) (PNiPAm). Está também referenciado como polímeros termo-sensíveis o poli(ácido láctico)-poli(etilenoglicol)-poli(ácido láctico) (PLLA-PEG-PLLA) e o poli(oxido etileno)-poli(oxido propileno)-poli(oxido etileno) (PEO–PPO–PEO).^{14,15,17,46,47,52,76}

2.4.2. 2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO₂MA)

Os polímeros com base no monómero MEO₂MA é um polímero constituído na sua cadeia por monómeros de metacrilato e macromonómeros de polietilenoglicol (PEG) nas cadeias laterais (figura 14), possui características semelhantes ao PNIPAm por exibir uma temperatura crítica de solução mínima (LCST) próxima da temperatura do corpo humano e ser biocompatível, tornando-o promissor para a área de engenharia de células e tecidos.^{50,51,54} Estes polímeros por apresentarem uma variação da sua solubilidade em água induzida pela temperatura, tornaram-se materiais promissores para aplicações em bioengenharia como cromatografia de proteínas, bioadesão controlada, libertação controlada de fármacos e modificação de superfícies.^{50,51,54}



Figura 14 - Estrutura química do MEO₂MA.⁷⁷

Os polímeros termo-sensíveis são solúveis em água abaixo da sua temperatura de transição (LCST) e insolúveis acima desta temperatura de transição, originando a sua precipitação. Isto devese à sobreposição das interações entre as moléculas de água e os hidrogénios das cadeias laterais de oligo(etilenoglicol) do polímero sobre as interações hidrofóbicas, permitindo a solubilização do polímero em água (figura 15). Quando a temperatura da solução ultrapassa a LCST existe favorecimento termodinâmico das interações entre o polímero (polímero-polímero) em relação às interações água-polímero, o que favorece a precipitação do polímero. Assim, este tipo de polímeros pode ser usado para controlar a hidrofobicidade de uma superfície através da aplicação de um estímulo de temperatura ao seu ambiente. ^{50,51,54}



Figura 15 – Principais componentes do MEO₂MA. A) Constituição de um monómero de MEO₂MA. B) Estrutura química de um monómero de MEO₂MA, onde a vermelho está representada a parte hidrofóbica do polímero e a azul a parte hidrofílica.⁵¹

O polímero MEO₂MA foi caracterizado por Lutz et al.⁵¹ como detentor de uma resposta termosensível comparável à do PNIPAm que possui uma temperatura de transição fixa de 32°C. Este possui algumas desvantagens como uma temperatura de transição de fase irreversível e o monómero NIPAM ser carcinogénico ou teratogénico para os tecidos. A utilização do MEO₂MA foi identificada como alternativa ao PNIPAm por ter como vantagem uma transição de fase reversível pouco sensível à concentração do polímero em água, à força iónica e ao tamanho da cadeia. Possui uma temperatura de transição de 26°C, podendo este valor variar com o peso molecular do polímero, tornando algumas aplicações mais fáceis de controlar por estar menos próxima da temperatura do corpo. A técnica de polimerização mais comum para a síntese deste polímero é a polimerização de RAFT, que será descrita no próximo capítulo.^{50,51,54}

2.4.3. Polimerização via transferência de cadeia reversível por adiçãofragmentação

A polimerização via transferência de cadeia reversível por adição-fragmentação mais conhecida como polimerização RAFT, é um tipo de polimerização radicalar controlada que permite a síntese de arquitecturas poliméricas com características precisas e funções controladas. ^{60-63,65-68,78}

Esta polimerização permite um grande controlo sobre a polimerização o que reduz a polidispersividade, a arquitectura das cadeias, tolerância à funcionalização dos monómeros, possibilidade de uso de uma grande variedade de monómeros e solventes em vários tipos de condições experimentais e com custos reduzidos.^{60-63,65-68,78}

A polidispersividade resulta da duração das etapas de iniciação, propagação e terminação que ocorrerem muito rapidamente. A produção de copolimeros é possível quando na mistura da reacção existem mais do que um tipo de monómeros. A integração de cada monómero na cadeia dependa da sua concentração na solução e da sua reactividade.^{60-63,65-68,78}

A polimerização de RAFT permite a construção de polímeros com diferentes arquitecturas, sendo possível produzir homopolímeros, polímeros em bloco, polímeros em estrela e escovas de polímero pela simples retenção do agente de transferência de cadeia num substrato que permita a adição sequencial de monómeros e formar a arquitectura desejada.^{60-63,65-68,78}

Esta polimerização faz uso de um agente de transferência de cadeia (CTA) que possui a função de iniciar ou terminar reversivelmente a propagação dos radicais de monómero, sendo conhecido também como agente RAFT.^{60-63,65-68,78}

O agente RAFT é normalmente um grupo tritiocarbonato com substitutos R e Z (figura 16), podendo também ser ditiobenzoatos e ditiocarbamatos. Estes dois grupos (R e Z) deverão ser escolhidos de acordo com as condições da reacção, como a temperatura e os monómeros usados, uma vez que estes possuem uma influência directa na cinética e termodinâmica da reacção. O grupo Z é responsável pelo equilíbrio da ligação S=C. O grupo R é responsável pelo equilíbrio da reacção, sendo também responsável pela reiniciação e crescimento das cadeias de polímero. ^{60-63,65-68,78}



Figura 16 – Estrutura do agente RAFT tritiocarbonato.⁷⁸

O processo de polimerização de RAFT é uma sucessão de adição e fragmentação reversível das cadeias, iniciando-se quando o agente de transferência de cadeia reage com um radical de propagação originado pela decomposição do iniciador. Esta reacção forma um novo agente de transferência de cadeia e um novo radical, que possui a capacidade de reiniciar a polimerização. Este novo radical reage com os monómeros livres em solução e cria uma constante adição e fragmentação das cadeias de polímero, como ilustrado na figura 17. A polimerização termina quando a cadeia de polímero reage com o radical de terminação e não consegue adicionar mais monómeros à cadeia. ⁶⁰⁻



Figura 17 – Crescimento de uma cadeia na polimerização de RAFT.⁶³

Na figura 18 está ilustrado o mecanismo da polimerização de RAFT, sendo composto por 5 passos principais que começam com a iniciação, seguindo-se a transferência reversível da cadeia, a reiniciação da reacção pelo radical, o equilíbrio das cadeias e finalmente a terminação da reacção.

Para se conseguir obter uma reacção de polimerização eficiente é necessário uma rápida iniciação das cadeias de polímero. O agente de transferência de cadeia (CTA) deverá possuir uma boa taxa de adição-fragmentação dos seus radicais de propagação e a taxa de transferência de espécies activas do CTA deverá ser igual ou superior à taxa de propagação. A ocorrência de cadeias mortas pode ser minimizada pelo controlo da concentração de espécies activas, devendo esta concentração ser baixa.^{60-63,65-68,78}

Reversible chain transfer

Ini



Figura 18 – Mecanismo da polimerização de RAFT.⁶³

Neste trabalho o agente de transferência de cadeia utilizado foi o 4-ciano-4-[(Dodecilsulfaniltiocarbonil) sulfanil] ácido pentanóico (figura 19) e é específico para a polimerização de metacrilatos. Este agente RAFT é um tritiocarbonato que possui uma elevada constante de transferência de cadeias e é muito estável.⁷⁸



Figura 19 - Agente de RAFT 4-ciano-4-[(Dodecilsulfaniltiocarbonil) sulfanil] ácido pentanóico. Na caixa a vermelho encontra-se o grupo Z, responsável pelo equilíbrio da ligação S=C, enquanto na caixa a azul encontra-se o grupo R, responsável pelo equilíbrio da reacção e pela reiniciação e crescimento das cadeias de polímero.⁷⁹

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Neste capítulo serão descritos todos os materiais, métodos de síntese e caracterização aplicados para a produção das nanofibras termo-sensíveis com polímero MEO₂MA e dos filmes termo-degradáveis de MEO₂MA/PCL.

3.1. Scaffolds de nanofibras de policaprolactona termo-sensíveis

3.1.1. Preparação de nanofibras de policaprolactona

3.1.1.1. Preparação de soluções de policaprolactona

Para a síntese de nanofibras de policaprolactona alinhadas, preparou-se soluções de 6% (w/w) de policaprolactona (Sigma, 70000-90000 peso molecular) em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2propanol (HFP, Sigma). Para a produção de nanofibras de policaprolactona desalinhadas preparou-se soluções de 4% (w/w) de policaprolactona (Sigma, 70000-90000 peso molecular) em 1,1,1,3,3,3hexafluoro-2-propanol (HFP, Sigma). Para dissolver e homogeneizar as soluções deixou-se durante a noite a agitar à temperatura ambiente.

3.1.1.2. Produção de *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona por *electrospinning*

O modelo de *electrospinning* usado na produção de nanofibras consiste numa fonte de alta tensão (Glassman High Voltage, Inc., Série EL, Modelo PS/EL40P01), uma bomba de seringas (KDS Scientific, Modelo KDS Legato 210), um tubo de Teflon para transportar as soluções de polímero da seringa para a agulha (EFD International, Inc., Agulha de ponta com válvula de dispensa) com diâmetro de 0.84mm, seringas (VWR, Henke Sass Wolf), duas placas de alumínio e uma placa circular de cobre.

Foram utilizados parâmetros de síntese diferentes e colectores diferentes para a produção de nanofibras alinhadas e desalinhadas. Para a produção de nanofibras alinhadas de policaprolactona foram utilizadas como colector das nanofibras duas placas de aço inoxidável rectangulares colocadas paralelamente com uma distância de 3 cm entre si, tendo sido utilizado como parâmetros fixos padrão o caudal da solução de polímero (1mL/h), a distância entre agulha e placas (20cm) e o potencial elétrico (26kV). Como parâmetros dinâmicos durante a síntese de nanofibras teve-se a humidade relativa num intervalo de 25-50% e temperatura 15-25°C. Para a produção de nanofibras desalinhadas de policaprolactona, foi utilizado como colector das nanofibras uma placa circular de cobre, tendo sido utilizado como parâmetros fixos padrão o caudal da solução de polímero como (0.8mL/h), a distância entre agulha e placas (25cm) e o potencial elétrico (20kV). Como parâmetros dinâmicos durante a síntese de nanofibras uma placa circular de cobre, tendo sido utilizado como parâmetros fixos padrão o caudal da solução de polímero como (0.8mL/h), a distância entre agulha e placas (25cm) e o potencial elétrico (20kV). Como parâmetros dinâmicos durante a síntese de nanofibras desalinhadas teve-se a humidade relativa num intervalo de 25-50% e temperatura 15-25°C. Nesta abordagem, as lamelas circulares de vidro (VWR, 13 mm de diâmetro) são previamente colocadas em cima do colector, realizando-se a deposição directamente sobre as lamelas que servirão de substrato para os *scaffolds*.

Após deposição das nanofibras de policaprolactona deixou-se repousar durante 2 horas de modo a permitir uma boa secagem destas antes de se proceder à fixação em lamelas circulares de

vidro. Na fixação procede-se à colagem nos bordos de lamelas circulares de vidro com cola biocompatível (Silastic-Silicone adesivo médico, tipo A), que depois são colocadas em cima das nanofibras alinhadas situadas entre as placas paralelas. Para as nanofibras desalinhadas, com a ajuda de uma agulha é espalhada a cola biocompatível nos bordos das lamelas sobre as nanofibras deixando-se secar. Após o passo de fixação para os diferentes tipos de nanofibras deixa-se secar durante 12 horas, utilizando-se depois desse período um bisturi para recolher os scaffolds de nanofibras de policaprolactona de ambos os colectores.

3.1.1.3. Funcionalização das nanofibras de policaprolactona

Para realizar este procedimento são preparados uma solução de etanol (Fischer)/água (1/1, v/v) e uma solução de 10% de 1,6-diaminohexano em isopropanol (Fischer chemical), deixando-se a homogeneizar por agitação magnética durante a noite. Após a preparação das soluções, os *scaffolds* de policaprolactona são colocados em placas de poços e são imersos durante duas horas na solução de etanol/água com agitação leve, sendo de seguida lavados com água destilada. De seguida os *scaffolds* são imersos em isopropanol durante dois minutos para remover o excesso de água da lavagem. Retira-se o isopropanol e adiciona-se a solução de 10% de 1,6-diaminohexano, deixando-se a incubar a 37°C durante três horas. Após o tempo de incubação a solução de aminólise é retirada e adiciona-se água destilada durante 5 minutos para remover o excesso de 1,6-Diaminohexano que não reagiu, retira-se a água e adiciona-se novamente água destilada, deixando-se em agitação leve durante 24 horas. Após as 24 horas remove-se o sobrenadante dos poços e deixa-se os scaffolds a secar durante 24 horas no excicador sob vácuo. O volume utilizado para imersão dos scaffolds foi de 300µL em todas as soluções.

3.1.2. Preparação e caracterização dos polímeros termo-sensíveis 2(2metoxietoxi)etil-metacrilato (MEO₂MA) e 2(2-metoxietoxi)etil-metacrilato-co-N-Acriloxisuccinimida [MEO₂MA-co-NAS]

Nesta parte do trabalho pretendeu-se sintetizar por polimerização de adição-fragmentação reversível das cadeias (RAFT) o polímero termo-sensível MEO₂MA para posterior ligação às nanofibras de policaprolactona e o copolimero MEO₂MA-co-NAS com o monómero reactivo N-Acriloxisuccinimida (NAS), que possui um derivado de éster activado que permite a funcionalização do polímero com compostos fluorescentes e outras moléculas de interesse com grupos amina.

O número de monómeros pretendidos por cadeia são dados pela razão [M]/[Agente de RAFT+Iniciador], escolhendo-se uma razão de 600, tendo-se definido uma razão [Iniciador]/[CTA] de 0.1 para o copolimero MEO₂MA-co-NAS foi definida uma percentagem de NAS de 2% por cada cadeia formada. Através dos pesos moleculares do iniciador 2,2'-Azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN, Fluka), do NAS (Sigma), do monómero MEO₂MA (Sigma), do 4-ciano-4-[(Dodecilsulfaniltiocarbonil) sulfanil] ácido pentanóico (Agente RAFT, Sigma) e Isopropanol (Fischer) foi possível calcular as quantidades necessárias para realizar a polimerização dos polímeros.

Para a síntese do polímero MEO₂MA (figura 20) com 600 monómeros por cadeia pesa-se num balão de fundo redondo sob a atmosfera de árgon 1mg de AIBN, 24,58 mg de agente de RAFT e 7,565g de MEO₂MA. Após a adição dos compostos, adiciona-se um agitador magnético, sela-se o

balão e inicia-se a homogeneização da mistura à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após esse tempo com o auxílio de uma seringa e uma agulha adiciona-se 17,9mL de isopropanol à mistura, deixando-se a homogeneizar a mistura em atmosfera de árgon mais 10 minutos. Passado o tempo de homogeneização o balão é colocado num banho de óleo a 90°C, sendo colocado um balão de plástico com Árgon na tampa do balão da reacção para permitir o equilíbrio de gases, durante 24-36 horas. Após esse período coloca-se o banho a 60°C para nos asseguramos que a reacção parou e que esta esteja quente o suficiente para ser possível precipitar, e retira-se a tampa do balão volumétrico. Com o auxílio de uma pipeta, precipita-se o polímero em éter gelado, observando-se a formação de duas fases em solução. Guarda-se a solução no frigorífico e renova-se o éter da solução por três dias consecutivos, observando-se sempre duas fases. Ao fim dos três dias remove-se o sobrenadante e deixa-se secar o precipitado que corresponde ao polímero MEO₂MA.



Figura 20 - Reacção de polimerização por RAFT do polímero MEO₂MA.⁴⁹

Para a síntese do polímero MEO₂MA-co-NAS com 600 monómeros por cadeia pesa-se num balão de fundo redondo sob a atmosfera de árgon 1mg de AIBN, 24,58 mg de agente de RAFT, 7,414g de MEO₂MA e 135,95mg de NAS. Após a adição dos compostos, adiciona-se um agitador magnético, sela-se o balão volumétrico e inicia-se a homogeneização da mistura à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após esse tempo com o auxílio de uma seringa e uma agulha adiciona-se 14,84mL de Dimetilformaldeído (DMF) seco à mistura, deixando-se a homogeneizar a mistura em atmosfera de árgon mais 20 minutos. Passado o tempo de homogeneização é colocado num banho de óleo a 90°C, sendo colocado um balão de plástico com árgon na tampa do balão da reacção para permitir o equilíbrio de gases, durante 48-60 horas. Após esse período coloca-se o banho a 60°C para nos asseguramos que a reacção parou e que esta esteja quente o suficiente para ser possível precipitar, e retira-se a tampa do balão volumétrico. Com o auxílio de uma pipeta, precipita-se o polímero em éter gelado, observando-se a formação de duas fases em solução. Guarda-se a solução no frigorífico e renova-se o éter da solução por três dias consecutivos, observando-se sempre duas fases. Ao fim dos três dias remove-se o sobrenadante e deixa-se secar o precipitado que corresponde ao polímero MEO₂MA-co-NAS.



Figura 21 - Reação de polimerização por RAFT do polímero [MEO₂MA-co-NAS].⁴⁹

Caracterizaram-se após a síntese ambos os polímeros em relação à temperatura de transição de fases e em relação ao tamanho das suas cadeias. Uma vez que o copolimero MEO₂MA-co-NAS foi sintetizado apenas com o objectivo de se realizar a caracterização por fluorescência, não foi realizada uma caracterização relativamente ao tamanho das suas cadeias por cromatografia de permeação em gel (GPC).

A cromatografia de permeação em gel (GPC) permite determinar experimentalmente a M_n (Massa molar numérica), M_w (Valor médio da distribuição da massa molecular) e a polidispersividade da amostra de polímero. Esta técnica consiste no uso de uma bomba peristáltica (Waters 510), colunas de cromatografia com esferas de gel (Phenomex Phenogel) e detectores (Waters 486 espectrofotómetro) na saída das colunas de cromatografia. Um *software* de aquisição de dados calcula o tempo que demoram as moléculas de polímero a atravessar as colunas de cromatografia. O tempo do percurso é proporcional ao tamanho das moléculas, uma vez que as moléculas mais pequenas demoram mais tempo a serem eluídas pela coluna quando comparado com as moléculas de polímero de maior tamanho que não ficam retidas na coluna de cromatografia.

A temperatura crítica de solução mínima (LCST) permite-nos saber a temperatura à qual o polímero começa a alterar a conformação da sua cadeia. Para a aplicação do polímero nas nanofibras termo-sensíveis para aplicação em engenharia de tecidos, pretendia-se que esta temperatura fica-se abaixo da temperatura de cultura das células (37°C), para que seja possível manipular os *scaffolds* termo-sensíveis sem alteração da sua superfície durante a cultura. Segundo Lutz et al. a temperatura crítica de solução mínima do polímero MEO₂MA é de 26°C o que oferece uma boa margem de manipulação dos *scaffolds* termo-sensíveis durante a cultura.⁵¹

Para estudar a temperatura crítica de solução mínima (LCST) dos polímeros MEO₂MA e [MEO₂MA-co-NAS] prepararam-se uma solução em água com uma concentração de 1mg/ml para ambos os polímeros deixando-se a agitar durante a noite. Esta caracterização foi realizada no espectrofotómetro (Jasco V-660) que possui um equipamento de Peltier capaz de controlar a temperatura de uma solução dentro de uma célula de quartzo. Para a caracterização dos dois polímeros foi utilizado como parâmetros um intervalo de comprimentos de onda de 250-800nm, uma rampa de aquecimento da solução de polímero de 1°C/min num intervalo de 15°-35°C, agitação magnética da solução de 200rpm dentro de uma célula de quartzo de 1cm.

3.1.3. Preparação e caracterização dos *scaffolds* de policaprolactona termosensíveis

Nesta parte do trabalho ligou-se o polímero MEO₂MA às nanofibras de policaprolactona, de modo a induzir sensibilidade térmica às nanofibras por funcionalização da sua superfície com o polímero. Pretendeu-se também caracterizar a cobertura de polímero sobre as nanofibras de modo a avaliar a eficácia do método utilizado, e para tal marcaram-se quimicamente as nanofibras de policaprolactona e o polímero MEO₂MA-co-NAS com duas moléculas fluorescentes, com máximos de absorção e emissão de fluorescência distintos entre si que permitiram avaliar a colocalização nos *scaffolds* termo-sensíveis fluorescentes.

Após ter sido produzido e funcionalizado por aminólise os scaffolds de nanofibras de policaprolactona, e ter sido sintetizado o polímero MEO₂MA, foi realizada a ligação deste às nanofibras através de um agente de activação N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiamida hidrocloreto (EDC), que promove uma ligação entre o grupo carboxilo do polímero e os grupos amina presentes nas nanofibras. Primeiro preparou-se uma solução de polímero, em que a concentração é variável de acordo com o número de scaffolds que se pretende funcionalizar. Para tal utiliza-se por cada amostra 50mg de polímero para 1mL de DMSO seco (Sigma), pesando-se primeiro a quantidade de polímero num frasco de vidro, em atmosfera de árgon durante 5 minutos. Após esse período, adiciona-se ao polímero a quantidade equivalente de DMSO seco com o auxílio de uma seringa e uma agulha, deixando-se dissolver por agitação em atmosfera de árgon. Quando a solução está homogeneizada adiciona-se 17µL de EDC por amostra e deixa-se homogeneizar por agitação em atmosfera de árgon. De seguida os scaffolds de nanofibra de policaprolactona são colocados dentro de frascos, selados e cria-se uma atmosfera de árgon durante 5 minutos. Após esse tempo retira-se 1mL da solução de polímero e adiciona-se directamente sobre o scaffold devendo ter o cuidado de o deixar imerso, repetindo-se o mesmo processo para os restantes scaffolds. Quando todos os scaffolds estão imersos em solução de polímero colocam-se estes durante 48 horas a incubar à temperatura ambiente sobre agitação circular a 300 rpm. Quando finalizado o tempo de incubação, retira-se a solução de polímero e adiciona-se 2mL de uma solução de 50%(v/v) de isopropanol/água, deixando-se a agitar a 300rpm durante 1 hora, retira-se a solução de isopropanol/água e adiciona-se 3mL de água, deixando-se a agitar durante 1 hora. Após as duas etapas de lavagem, os scaffolds colocam-se no excicador durante 24 horas em vácuo e estão preparados para cultura celular.

Para ser possível caracterizar a cobertura do polímero MEO₂MA sobre os *scaffolds* de policaprolactona, realizou-se um estudo de colocalização que consiste na marcação dos *scaffolds* de nanofibras com uma molécula fluorescente e na marcação do polímero com outra molécula fluorescente com máximos de absorção e emissão de fluorescência distintos, que por microscopia de fluorescência por varrimento de laser nos permite visualizar a sobreposição espacial dos dois marcadores fluorescentes.

Para realizar esta experiência foi necessário marcar os *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona com o corante Cy5-amina (Lumiprobe) (figura 22), que possui uma cadeia carbonada com uma terminação NH₂ e emite vermelho.



Figura 22 – Estrutura química do corante Cy5-amina.⁸⁰

Para preparar as nanofibras de policaprolactona coradas, prepara-se primeiro uma solução de 0.1% de Cy5-amina em isopropanol espectroscópico (Fischer), deixando-se a agitar durante a noite para que todo o corante fique dissolvido no solvente. Após este período adiciona-se 0,093% do volume da solução de Cy5-amina em Trietilamina (Et₃N) (Sigma) e deixa-se a agitar durante 24 horas e após este tempo coloca-se os scaffolds de nanofibras em placas de poços e adiciona-se a cada scaffold 300µL de solução de Cy5-amina, deixando-se a incubar durante 24 horas em agitação leve à temperatura ambiente. No fim retira-se o sobrenadante dos poços e adiciona-se 200µL de isopropanol, realizando-se uma breve agitação durante 15 segundos. Após a lavagem com isopropanol realiza-se uma reacção de aminólise, descrito anteriormente, para funcionalizar as nanofibras coradas com grupos NH₂. Todo o processo é realizado ao abrigo da luz.

Ao mesmo tempo prepara-se o polímero MEO₂MA-co-NAS com o corante *Lucifer yellow* (figura 23). Pesa-se num frasco de vidro 50mg de polímero por cada scaffold de nanofibras utilizado, adicionando-se 1% do peso do polímero adicionado em Lucifer yellow. O frasco é fechado sob atmosfera de árgon durante 5 minutos, adicionando-se DMF seco na proporção de 2,5mL por scaffold de nanofibras usado, deixando-se homogeneizar por agitação magnética durante 15 minutos em atmosfera de árgon. Após estes passos coloca-se o frasco num banho de óleo a 45°C durante 4 dias. Após os 4 dias de reação adiciona-se à solução etanolamina (Sigma) na proporção de 20 vezes o número de moles de NAS no polímero, para neutralizar os grupos reactivos NAS a que o corante não se ligou. Após a adição de etanolamina baixa-se a temperatura do banho para 30°C e deixa-se a agitar durante 3 dias. Após os três dias de reação precipita-se o polímero em éter frio, renovando-se o éter durante 2 dias consecutivos. Quando se termina a lavagem do polímero corado retira-se o sobrenadante e deixa-se secar para evaporar o solvente.



Figura 23 - Estrutura química do corante Lucifer yellow.⁸¹

Quando se tem preparado as nanofibras de policaprolactona coradas e o polímero corado realiza-se a ligação dos dois pelo método descrito anteriormente para a ligação do polímero MEO₂MA com as nanofibras de policaprolactona. Para tal pesa-se 50 mg de polímero MEO₂MA-Ly num frasco de vidro por cada scaffold de policaprolactona corado, sela-se sob uma atmosfera de árgon durante 5 minutos. Após esse tempo adiciona-se 1mL de DMSO seco por cada scaffold de policaprolactona corado, deixando-se em agitação em atmosfera de árgon. Quando a solução está homogeneizada adiciona-se 17µL de EDC por amostra e deixa-se homogeneizar por agitação em atmosfera de árgon. De seguida os *scaffolds* de nanofibra de policaprolactona corados são colocados dentro de frascos, sob uma atmosfera de árgon durante 5 minutos. Após esse tempo durante 5 minutos. Após esse tempo durante 6 policaprolactona corado a solução está homogeneizada adiciona-se 17µL de EDC por amostra e deixa-se homogeneizar por agitação em atmosfera de árgon.
polímero e adiciona-se directamente sobre o scaffolds, devendo ter o cuidado de os deixar imersos, repetindo-se o mesmo processo para os restantes *scaffolds*. Após 48 horas a reagir à temperatura ambiente com agitação circular a 300 rpm, retira-se a solução de polímero e adiciona-se 2mL de uma solução de 50%(v/v) de isopropanol/água, deixando-se a agitar durante 1 hora a 300rpm. Após esse tempo retira-se a solução de isopropanol/água e adiciona-se 3mL de água, deixando-se a agitar durante 1 hora. Após as duas etapas de lavagem os *scaffolds* colocam-se no excicador durante 24 horas sob vácuo.

3.2. Scaffolds termo-degradáveis de MEO₂MA/Policaprolactona

3.2.1. Preparação e caracterização dos *scaffolds* termo-degradáveis de MEO_2MA/PCL

Para a síntese de *scaffolds* termo-degradáveis prepararam-se soluções de 20% (w/w) de policaprolactona (Sigma, 70000-90000 peso molecular) e polímero MEO₂MA produzido em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP, Sigma) em diferentes proporções. Para o estudo destes *scaffolds* prepararam-se soluções com as proporções 90%MEO₂MA/10%PCL, 75%MEO₂MA/25%PCL e 50%MEO₂MA/50%PCL, em que a mistura dos dois perfaz os 20% (w/w) em HFP. Deixa-se homogeneizar as soluções durante 24h em agitação leve à temperatura ambiente.

Antes de se efectuar o electrospinning colocam-se as soluções no vortéx durante 10 minutos para garantir que a solução se encontra bem homogénea. Para todas as soluções os parâmetros de síntese fixos são o colector circular de cobre, o potencial eléctrico (25kV), a distância entre o colector e a agulha (25cm) e o caudal (1,5mL/h). Como parâmetros de síntese variáveis entre as soluções teve-se a temperatura no intervalo de 15-25°C e uma humidade relativa de 25-50%. Nesta abordagem as lamelas circulares de vidro (VWR, 32 mm de diâmetro) são colocadas em cima do colector, realizando-se a deposição directamente sobre as lamelas que servirão de substrato para os *scaffolds*. Deixa-se repousar durante 2 horas de modo a permitir uma boa secagem destas antes de se proceder à fixação. Depois de se ter permitido a secagem, com a ajuda de uma agulha é espalhada a cola biocompatível nos bordos das lamelas sobre os *scaffolds* termo-degradáveis. Após a fixação deixa-se secar durante 12 horas, e após esse período utiliza-se um bisturi para recolher os *scaffolds* de ambos os colectores. De seguida, as amostras são colocadas no excicador em vácuo durante 24 horas. Os passos seguintes à recolha dos *scaffolds* são a caracterização por microscopia electrónica de varrimento (SEM) e microscopia de força atómica (AFM) e utilização para cultura de células.

Para perceber as alterações na estrutura dos *scaffolds* que levam à libertação das células, foi realizada uma experiência onde se pretende simular o ambiente de cultura a que os *scaffolds* serão expostos. Nesta experiência pretende-se caracterizar os *scaffolds* termo-degradáveis por SEM, relativamente à degradação da sua estrutura em água durante os 7 dias de cultura a 37°C, retirando-se amostras aos dias 1, 4 e 7 dias. Pretendeu-se também analisar a velocidade de degradação dos *scaffolds* termo-degradáveis em água fria a 10°C. Colocaram-se as amostras em água fria e retirando-se uma amostra ao fim de uma e duas horas.

3.3. Caracterização dos scaffolds por técnicas de microscopia

3.3.1. Microscópio electrónico de varrimento (SEM)

Para utilizar esta técnica a superfície da amostra é previamente preparada para ser electricamente condutora. Para caracterizar as amostras de polímero estas foram cobertas com uma fina camada de liga de ouro/paládio para transformar a sua superfície condutora e caracterizável por SEM.⁷⁰

Neste trabalho foi utilizado o equipamento de SEM (FEG/EDS/EBSD-JEOL JSM-7001F/Oxford250/HKL INCA Energy) com intensidades de feixes de electrões entre os 10kV e os 20kV. As amostras foram previamente cobertas com uma liga de ouro pelo equipamento (Polaron -Quorum Technologies sputter coater and evaporator).

3.3.2. Microscópio de força atómica (AFM)

Esta técnica utiliza um cantilever que varre a superfície da amostra, e pelas forças de atracção e repulsão com a superfície cria a imagem da topografia das amostras. A interacção entre o cantilever e as amostras é quantificada através de um laser e uma matriz de fotodíodos. Neste trabalho a caracterização da superfície dos scaffolds produzidos foram analisadas pelo equipamento Nanosurf Easyscan 2 Flex no modo de não contacto.

3.3.2. Microscópio confocal de varrimento de laser (LCSM)

A microscopia confocal de varrimento de laser é usada para caracterizar amostras fluorescentes. Este tipo de microscópio de varrimento utiliza um laser focado com um determinado comprimento de onda, que irradia a amostra e mede a fluorescência emitida por esta.^{72,73}

Neste trabalho foi utlizado o equipamento Leica TCS-SP5 Multifotão/Confocal de fluorescência com um laser de iões de Ar a 458nm e um laser Hélio-Néon a 633 nm.

3.4. Cultura de células

Realizaram-se nos *scaffolds* termo-sensíveis e termo-degradaveis um estudo relativamente à proliferação, viabilidade e taxa de libertação de células por estímulos de temperatura com células mesenquimais.

3.4.1. Preparação de cultura de células mesenquimais nos scaffolds

Para realizar este estudo os *scaffolds* produzidos são imobilizados em placas de poços de cultura de baixa aderência celular (Corning) com cola biocompatível. Após a colagem, deixa-se secar no excicador sob vácuo. Quando as células estão prontas para cultura incubam-se os *scaffolds* em solução de antibiótico (Invitrogen) durante 3 horas a 37°C. Após as três horas de incubação retira-se o antibiótico e realiza-se o cultivo das células de acordo com a tabela 1. Nesta tabela estão representados o número de células utilizadas para o cultivo nos *scaffolds*, os meios de cultura usados para cada tipo de scaffold e o tempo de cultura utilizado. Foram utilizados como meios de cultura os

meios DMEM+10%FBS (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Life technologies) próprio para cultura de células de mamíferos e de origem animal (Sérum fetal bovino-FBS), Xenofree (Meio sintético livre de factores xenogénicos – Life technologies) formulado para cultura de células mesenquimais e o meio *Xenofree* com iniciador celular (*Cell start*TM – Life technologies) que consiste na adição prévia de um suplemento com proteínas de adesão e factores de crescimento celular aos *scaffolds* e incubação dos mesmos durante 1 hora a 37°C. Os meios de cultura são adicionados a uma temperatura de 37°C após 30 minutos pré-cultura com células mesenquimais, permitindo que estas adiram ao *scaffolds* antes de ser adicionado o meio de cultura. Após a adição do meio as placas de cultura são colocadas numa incubadora a 37°C sob uma atmosfera humidificada de 5% de CO₂.

Tabela 1 – Estratégias	de cultura	utlizadas	para o	estudo	de	proliferação,	viabilidade	е	libertação
celular por estímulos de	temperatur	a.							

Scaffolds	Células cultivadas	Meios de cultura utilizados	Tempo de cultura	
Termo-sensíveis alinhados	10000	DMEM+10%FBS/Xenofree /Xenofree c/ Cell start [™]	9 Dias	
Termo-sensíveis desalinhados	10000	DMEM+10%FBS/Xenofree /Xenofree c/⊂Cell start [™]	9 Dias	
Termo-degradáveis 90%MEO₂MA/10%PCL	30000	Xenofree	7 Dias	
Termo-degradáveis 75%MEO₂MA/25%PCL	30000	DMEM+10%FBS/Xenofree	7 Dias	
Controlo (nanofibras de policaprolactona)	10000/30000	DMEM+10%FBS/Xenofree /Xenofree c/ Cell start [™]	9 Dias	

O número de células usado durante o cultivo foi inferior para os *scaffolds* termo-sensíveis comparativamente aos *scaffolds* termo-degradáveis, devido à diferença na área de superfície disponível entre os *scaffolds* produzidos. As diferenças entre os meios de cultura utilizados tiveram como objectivo, o estudo da proliferação e libertação celular nos diferentes *scaffolds* para diferentes tipos de meio. As diferenças observadas relativamente aos métodos de libertação celular e tempo de cultura foram resultado da adaptação e evolução das técnicas, com o objectivo de maximizar a eficácia de libertação de células dos *scaffolds* cultivados.

Após o cultivo das células em todas as condições presentes na tabela 1, realiza-se a renovação dos meios de cultura a cada 4 dias.

3.4.2. Quantificação celular por Alamar Blue

O método de quantificação celular *Alamar Blue* (Invitrogen) é um método indirecto de quantificação do crescimento celular ao longo do tempo, sem sacrificar as células ou os *scaffolds*. Tem como base uma reação de oxidação-redução de um corante azulado não fluorescente denominado resazurina, que reduz-se para formar resofurina, um corante de cor vermelha com emissão de fluorescência. Neste método as células viáveis metabolizam a resazurina e convertem-na por oxidação para resofurina, que é proporcional ao número de células presente numa dada amostra. A actividade metabólica celular foi analisada com recurso a medições de fluorescência pelo equipamento (Infinite 200 PRO multimode reader, Tecan).

Correlacionou-se primeiro o valor de fluorescência quantificado pelo equipamento e o correspondente número de células numa dada amostra através de uma curva de calibração. Para tal cultivou-se em placas de cultura de 12 poços de poliestireno, quantidades crescentes de células por poço (1000-50000) em meio *DMEM*+10%*FBS* e *Xenofree* durante 24 horas. Após esse período de incubação, adiciona-se aos poços 100µL de *Alamar Blue* para criar uma solução no poço de 1% (v/v) em meio de cultura, incubando-se a placa com a solução durante 2 horas a 37°C numa sob uma atmosfera humidificada de 5% de CO₂. No fim das duas horas quantifica-se a fluorescência em cada um dos poços, realizando-se de seguida a contagem do número de células presentes nos mesmos por libertação enzimática, contando-se as células com recurso a azul de tripano e hemocitómetros. Após obter-se a curva de calibração realizou-se a quantificação das células presentes nos *scaffolds* termo-sensíveis e termo-degradáveis, adicionando-se ao meio de cultura 100µL de *Alamar Blue* para criar uma solução no poço de 1% (v/v) em meio de cultura. Esta quantificação é efectuada anteriormente aos testes de libertação celular para se conhecer o número de células presentes nos *scaffolds* cultivados. Após a adição de *Alamar Blue* incubasse a placa com a solução durante 2 horas a 37°C numa incubadora sob uma atmosfera humidificada de 5% de CO2.

A intensidade de fluorescência da solução de *Alamar Blue* com meio celular foi medida utilizando um leitor de microplacas, com um comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm. Após a leitura e com recurso à equação obtida pela curva de calibração quantificou-se o número de células presentes em cada scaffold.

3.4.3. Testes de libertação celular nos scaffolds por estímulo térmico

Após ser conhecido o número de células presentes no scaffold, realiza-se o método de libertação celular nos *scaffolds* por estímulos térmicos. Com o uso deste método pretende-se verificar a eficiência de libertação nos *scaffolds* termo-sensíveis e termo-degradáveis pela diminuição da temperatura do meio. O princípio de funcionamento dos *scaffolds* termo-sensíveis e termo-degradáveis (figura 24) pretende demonstrar que à temperatura de 37°C as cadeias de polímero na superfície dos *scaffolds* encolhem-se e permitem que as células adiram e criem uma matriz extracelular. Por diminuição da temperatura do meio as cadeias de polímero na superfície dos *scaffolds* esticam-se e as células são libertadas para o meio de cultura juntamente com a sua matriz extracelular.



Figura 24 - Princípio teórico de funcionamento dos scaffolds de nanofibras termo-sensíveis. a) Células foram cultivadas sobre o scaffold com o polímero a 37°C e formam um tecido. b) Com o decréscimo da temperatura no meio celular as cadeias de polímero esticam-se e as células começam a soltar-se do scaffold com a sua matriz extracelular a verde.¹⁵

Para realizar estes testes foi adicionado ao meio de cultura com os *scaffolds* e as células aderentes 1 mL de meio IMDM fresco (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*), que baixa rapidamente a temperatura do meio, colocando-se a placa numa cama de gelo para manter a temperatura a 10°C durante 1 hora. Durante este período as placas são agitadas manualmente a cada dez minutos por 2 minutos. Após uma hora a placa é retirada da cama de gelo e centrifugam-se os meios de cultura durante 7 minutos a 1250rpm em tubos de *Falcon*. Após a centrifugação remove-se o sobrenadante e solubiliza-se o precipitado num volume de 150µL.

Realiza-se a contagem das células mesenquimais que foram libertadas por acção da temperatura, avaliando-se também a viabilidade do método pela quantidade de células mortas durante o processo. Para tal colocam-se amostras em duplicado de 10µL da solução de células de cada *scaffold* numa placa de 96 poços, adicionando-se de 10µL de azul tripano. Homogeneiza-se as soluções em cada poço e coloca-se num hemocitómetro. A contagem das células é realizada com a ajuda de um microscópio óptico, contando-se as células presentes em 9 quadrantes do hemocitómetro. Após a contagem calcula-se através da equação 1, determina-se o número de células presentes na solução de células de cada *scaffold*. Após a contagem os scaffolds são autoclavados e destruídos.

$$C\acute{e}lulas_{Scaffold} = \frac{C\acute{e}lulas_{contadas}}{9 \ quadrantes} \times 0.15 \times 2 \times 10000 \qquad (Equação 1)$$

Para quantificar a multiplicação celular ocorrida durante as experiencias nos *scaffolds* com células mesenquimais, utiliza-se a equação 2, que se trata de uma razão entre o número de células contadas no *scaffold* pela equação 1 com o número de células quantificado por *Alamar blue*.

$$Multiplica \zeta \tilde{a} o_{celular} = \frac{C \acute{e} lulas_{contadas}}{C \acute{e} lulas quantificadas_{Alamar blue}}$$
(Equação 2)

Para quantificação da adesão celular de células mesenquimais ocorrida nos *scaffolds* durante as experiências, utiliza-se a equação 3, que se trata de uma razão entre o número de células mesenquimais quantificadas por Alamar blue após 1 dia de cultura e o número de células mesenquimais inicialmente cultivadas no *scaffold* no dia anterior.

$$Ades\tilde{a}o_{celular} = \frac{Quantificação_{Alamar blue 1 dia cultura}}{Células_{cultivadas}} \times 100$$
(Equação 3)

Capítulo 4 - Resultados e discussão

De acordo com o estado da arte, a utilização de *scaffolds* em engenharia de células e tecidos torna-se decisivo quando pretendemos cultivar células aderentes, como as células mesenquimais. Estas para proliferarem e se diferenciarem necessitam de suportes com determinadas propriedades que simulem o nicho celular ou a estrutura da sua matriz extracelular.

O método convencional para libertar células de superfícies nas quais se encontram aderidas envolve a utilização de enzimas. Os métodos de libertação enzimáticos são nocivos para as células pois danificam a membrana celular e a matriz extracelular formada pelas células. Nos *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona por outro lado a eficiência de libertação de células por métodos enzimáticos é limitada.

No esquema da figura 25, está representada a estratégia de investigação utilizada neste trabalho.



Figura 25- Estratégia de investigação utilizada neste trabalho.

4.1. Caracterização dos scaffolds de nanofibras de policaprolactona

As nanofibras de policaprolactona foram produzidas por *electrospinning*, tendo sido preparada para a produção de nanofibras de policaprolactona alinhadas uma solução de 6% de PCL em HFP, e para a produção de nanofibras de policaprolactona desalinhadas uma solução de 4% de PCL em HFP.

Utilizaram-se dois tipos de colectores para a deposição das nanofibras durante o *electrospinning*:

- Duas placas paralelas de aço inoxidável para a deposição de nanofibras alinhadas;
- Uma placa circular de cobre para a deposição de nanofibras desalinhadas.

A topologia e a morfologia dos *scaffolds* de nanofibras desalinhados foram caracterizadas por SEM e AFM (figura 26 e 27). Pela caracterização das nanofibras de policaprolactona desalinhadas por SEM e AFM, observou-se que os *scaffolds* produzidos possuem uma boa densidade de nanofibras de forma cilíndrica, como pretendido. Observa-se nas amostras que as nanofibras possuem diâmetros pouco uniformes entre si, originando áreas de superfície de adesão dispersos no *scaffold*. Com o tratamento de superfície nas nanofibras por reação de aminólise, verificou-se que a topologia e a morfologia dos *scaffolds* não se alteraram, quando comparado com as amostras sem tratamento.



Figura 26 - Imagens de SEM de nanofibras de policaprolactona desalinhadas preparadas a partir de soluções de 4% de PCL em HFP com e sem aminólise. A,B e C) Nanofibras desalinhadas de policaprolactona às escalas 270×270µm, 50×50µm e 15×15µm respectivamente. D,E e F) Nanofibras desalinhadas de policaprolactona com aminólise às escalas 270×270µm, 50×50µm a 15×15µm respectivamente.



Figura 27 - Imagens de nanofibras de policaprolactona desalinhadas preparadas a partir de soluções de 4% de PCL em HFP obtidas por AFM. Na primeira imagem à esquerda temos a imagem da topografia obtida pelo microscópio. Na imagem ao centro temos a imagem construída pela variação da amplitude do cantilever durante o varrimento. Na imagem à direita temos a imagem construída pela variação da frequência de oscilação do cantilever durante o varrimento da amostra.

Foi registada a distribuição dos diâmetros das nanofibras alinhadas e desalinhadas (*software ImageJ*), tendo-se analisado cerca de 100 nanofibras de cada tipo de *scaffold*, com uma média de três medidas por nanofibras. Realizou-se a análise da distribuição dos diâmetros das nanofibras desalinhadas (figura 28).



Figura 28 - Histograma da frequência dos diâmetros das nanofibras de policaprolactona desalinhadas numa amostra com aminólise a cinzento e sem tratamento a preto. O diâmetro médio para as nanofibras de policaprolactona desalinhadas sem aminólise foi (495±20nm), enquanto para as nanofibras de policaprolactona desalinhadas com aminólise foi (500±20 nm).

A média dos diâmetros das nanofibras desalinhadas de policaprolactona com e sem aminólise foi (500±20nm). Não se observou um aumento da média de diâmetros das nanofibras após aminólise significativo, concluindo-se que o tratamento de aminólise nas nanofibras não produz impacto no diâmetro das nanofibras.

A topologia e a morfologia dos *scaffolds* de nanofibras desalinhados foram caracterizadas por SEM e AFM (figura 29 e 30). Pela caracterização das nanofibras de policaprolactona alinhadas por SEM e AFM, observou-se uma boa densidade nos *scaffolds* produzidos e nanofibras com uma forma cilíndrica, como pretendido.

Como as nanofibras possuem diâmetros semelhantes, estas originam áreas de superfície de adesão uniformes. Após o tratamento de superfície nas nanofibras por reação de aminólise verificouse, que a topologia e a morfologia dos *scaffolds* não se alteraram, quando comparado com as amostras sem tratamento.



Figura 29 - Imagens de SEM de nanofibras de policaprolactona alinhadas preparadas a partir de soluções de 6% de PCL em HFP com e sem aminólise. A,B e C) Nanofibras de policaprolactona às escalas 270x270µm, 50x50µm e 15x15µm respectivamente. D,E e F) Nanofibras de policaprolactona com aminólise às escalas 270x270µm, 50x50µm e 15x15µm respectivamente.



Figura 30 - Imagens de nanofibras de policaprolactona alinhadas preparadas a partir de soluções de 6% de PCL em HFP obtidas por AFM. Na primeira imagem à esquerda temos a imagem da topografia obtida pelo microscópio. Na imagem ao centro temos a imagem construída pela variação da amplitude do cantilever durante o varrimento. Na imagem à direita temos a imagem construída pela variação da frequência de oscilação do cantilever durante o varrimento da amostra.

Realizou-se a análise da distribuição dos diâmetros das nanofibras alinhadas com e sem aminólise (figura 31).



Figura 31 - Gráfico da frequência dos diâmetros das nanofibras de policaprolactona alinhadas numa amostra com aminólise a cinzento e sem tratamento a preto. O diâmetro médio para as nanofibras de policaprolactona alinhadas sem aminólise foi (500±20 nm), enquanto para as nanofibras de policaprolactona desalinhadas com aminólise foi (510±25 nm).

A média dos diâmetros das nanofibras alinhadas de policaprolactona com e sem aminólise pelo histograma de frequência dos diâmetros foi (500±25nm). Analisando os resultados da caracterização das nanofibras de policaprolactona desalinhadas e alinhadas, registou-se uma média de 500nm de diâmetro para ambas as amostras. Conseguiu-se produzir nanofibras de policaprolactona com diâmetros inferiores a 1µm para os diferentes alinhamentos. Observou-se uma diferença entre os *scaffolds* alinhados e desalinhados relativamente às distribuições dos diâmetros das nanofibras. Para os *scaffolds* alinhados a distribuição de tamanhos é mais estreita que para os desalinhados, onde se observa uma distribuição dispersa das nanofibras. Esta diferença entre os *scaffolds* é um resultado comum, uma vez que os colectores usados possuem diferentes geometrias e originam campos eléctricos diferentes. Neste caso o campo eléctrico criado pelo colector das nanofibras alinhadas é mais estável no tempo, o que origina nanofibras mais uniformes entre si, enquanto o colector das nanofibras desalinhadas cria um campo pouco estável no tempo, o que origina uma grande dispersividade de tamanhos nas nanofibras.

4.2. Caracterização dos polímeros MEO₂MA e MEO₂MA-co-NAS

Os polímeros MEO₂MA e MEO₂MA-co-NAS foram sintetizados por polimerização de adiçãofragmentação reversível das cadeias mais conhecida como polimerização RAFT. Escolheu-se esta técnica por ser relativamente fácil, ser barata e produzir cadeias de polímero com baixa polidispersividade. O grau de polimerização previsto para os polímeros produzidos foi de 600 monómeros por cadeia.

O objectivo da utilização destes polímeros deve-se ao comportamento termo-sensível das suas cadeias em soluções aquosas, com uma transição de fase a rondar os 26°C. O facto de a sua transição de fase ser abaixo dos 30°C, traz vantagens para a sua aplicação com células estaminais que necessitam de ser incubadas a 37°C, oferecendo uma margem de manipulação de 10°C antes de alterar a conformação das cadeias, quando comparado com o polímero termo-sensível PNIPAm, que possui uma transição de fase de 32°C, oferecendo uma margem de manipulação das células estaminais de apenas 5°C.

A síntese de um copolimero de MEO₂MA-NAS deveu-se à necessidade de caracterização da cobertura das nanofibras com polímero. Para tal foi necessário funcionalizar o polímero com um corante fluorescente, o que se conseguiu preparando o copolimero MEO₂MA com um grupo funcional reactivo de N-Acriloxisuccinimida (NAS), que permite ligar compostos químicos como moléculas fluorescentes ao polímero.

O peso molecular e a polidispersividade do polímero foram obtidos por cromatografia de permeação gel (GPC). Na tabela 2 estão compilados o valor médio da polidispersividade das cadeias do polímero (Mw/Mn), a média numérica da Massa molar (Mn) e a média mássica da massa molecular (Mw) do polímero MEO₂MA (obtido para 3 injecções).

Tabela 2 – Resultado da cromatografia de permeação em gel do polímero MEO_2MA , relativamente à polidispersividade, Mn e Mw

Amostra	Média			
Polidispersividade				
Mw/Mn	1.23			
Massa molar (g/mol)				
(Mn)/10 ³	71±0.9			
(Mw)/10 ³	89±0.8			

Analisando os resultados obtidos por GPC do polímero MEO₂MA, pode afirmar-se que este possui uma polidispersividade baixa, de acordo com o método de polimerização utilizado.

Relativamente à média numérica de massa molar e à média mássica da massa molecular obtida, $(71\pm0.9)\times10^3$ g/mol e $(89\pm0.8)\times10^3$ g/mol respectivamente, indicam-nos a massa molar de uma cadeia de polímero na amostra. Uma vez que o polímero sintetizado foi projectado para possuir após a polimerização cadeias com aproximadamente 600 monómeros, calculou-se através da média numérica da massa molar (Mn) os monómeros que cada cadeia possui, pela massa molecular de um monómero de MEO₂MA e do agente RAFT utilizado, sendo estes de 188.22g/mol e 279.38g/mol, respectivamente.

 $Massa\ molecular_{cadeia} = Mn_{GPC} - M_{Agente\ de\ RAFT} = 71000 - 279.38 = 70720\ g/mol$

$$Mon \acute{o}meros\ _{cadeia} = \frac{Massa\ molecular_{cadeia}}{Massa\ molecular_{MO2MA}} = \frac{70720}{188.22} \cong 380$$

Foi obtido após polimerização aproximadamente 380 monómeros por cadeia e uma conversão das cadeias de 63%, valor que ficou aquém do projectado inicialmente que se situava nos 600 monómeros por cadeia. Este facto pode ser explicado pela reação de polimerização não ter sido completa ou por erros de pesagem dos reagentes. As razões para a reacção não ter sido completa são: a presença de oxigénio na reacção num dado momento da polimerização, que pode ter interrompido a polimerização, e uma conversão abaixo dos 100% como é habitual neste tipo de polimerizações.

A caracterização do polímero MEO₂MA e do copolimero MEO₂MA-co-NAS relativamente às suas temperaturas críticas de solução mínima (LCST) foi realizada por turbidimetria. Para tal dissolveram-se os polímeros em água em concentrações de 1mg/ml e analisou-se a sua transmitância por espectroscopia com o aumento da temperatura. Foi utilizado um intervalo de comprimentos de onda de 250-800nm e uma rampa de aquecimento de 1°C/min da solução de polímero num intervalo de 15°-35°C. Nas figuras 32 e 33, encontram-se os gráficos do comportamento do polímero MEO₂MA e MEO₂MA-co-NAS por %Transmitância vs. Temperatura.

Para se determinar as LCST's dos polímeros MEO₂MA e MEO₂MA-co-NAS calcularam-se as intersecções das rectas de ajuste (figura 32 e 33) a 25°C-28.5°C e 25.7°C e 30.1°C respectivamente. O valor médio de transmitância a estas temperaturas corresponde a uma LCST de 27°C para o

polímero MEO₂MA e 28°C para o copolimero MEO₂MA-co-NAS. As temperaturas críticas de solução mínima (LCST) calculadas encontram-se dentro do esperado, estando apenas 1-2°C acima da LCST referenciada por Lutz et al.⁵¹



Figura 32 – Gráfico da %Transmitância versus a Temperatura do polímero MEO₂MA numa solução de 1mg/ml a um comprimento de onda de 650nm e uma rampa de aquecimento de 1°C/min da solução de polímero num intervalo de 15°-35°C. Caracterização da LCST através de equações lineares em diferentes intervalos de temperatura: a equação que caracteriza o comportamento da zona a azul (y1=-0.0005x+100.42), da zona a vermelho (y2=-26.76x+768.4) e da zona a verde (y3=-0.6558x+25.824).



Figura 33 - Gráfico da %Transmitância versus a Temperatura do polímero MEO₂MA-co-NAS numa solução de 1mg/ml a um comprimento de onda de 650nm e uma rampa de aquecimento de 1°C/min da solução de polímero num intervalo de 15°-35°C. Caracterização da LCST através de equações lineares em diferentes intervalos de temperatura: a equação que caracteriza o comportamento da zona a azul (y1=0.0103x+99.891), da zona a vermelho (y2=-18.3x+570.19) e da zona a verde (y3=-1.5727x+67.045).

4.3. Caracterização das nanofibras de PCL termo-sensíveis

Nesta parte do trabalho serão apresentados os dados da caracterização das nanofibras de policaprolactona cobertas com polímero termo-sensível MEO2MA. Para se avaliar a eficiência da cobertura da fibra pelo polímero, realizou-se um ensaio de colocalização de fluorescência com as fibras marcadas por Cy5 e do polímero marcado com *Lucifer yellow*, por microscopia confocal de varrimento de laser. A outra etapa da caracterização envolveu a análise da morfologia das nanofibras de policaprolactona termo-sensíveis por microscopia electrónica de varrimento. A última etapa da caracterização efectuada nestes scaffolds envolveu o estudo morfologia dos scaffolds por microscopia de força atómica após incubação em água quente e água fria.

No ensaio de colocalização por fluorescência dos scaffolds termo-sensíveis, marcaram-se as nanofibras de policaprolactona e o polímero MEO₂MA-co-NAS com duas moléculas fluorescentes com emissões distintas entre si. As nanofibras de policaprolactona foram marcadas com Cy5 e o polímero MEO₂MA-co-NAS foi marcado com *Lucifer yellow* (Ly). Posteriormente realizou-se a ligação entre os dois materiais fluorescentes para produzir scaffolds termo-sensíveis fluorescentes e caracterizou-se os mesmos por microscopia confocal de varrimento laser. Na figura 34 estão representados os espectros de excitação e emissão das duas moléculas fluorescentes tendo sido utilizado como comprimento de onda de excitação da molécula Cy5 à linha de laser a 633nm e da molécula de *Lucifer yellow* à linha de laser a 458nm.



Figura 34 – Espectros de excitação (Tracejado) e emissão (Curvas preenchidas) das moléculas fluorescentes Lucifer yellow e Cy5. A Lucifer yellow possui um comprimento de onda de excitação máximo de 428nm e de emissão máximo de 536nm. A Cy5 possui um comprimento de onda de excitação máximo de 646nm e de emissão máximo de 662nm. Espectro construído no software BD Fluorescence spectrum viewer a multicolor tool.

Nas imagens de fluorescência dos *scaffolds* termo-sensíveis (figura 35) é possível observar a emissão de fluorescência das nanofibras (a verde), e do polímero termo-sensível (a vermelho), bem como a sobreposição das duas imagens, que permite avaliar a cobertura das nanofibras por polímero.

A análise da sobreposição das imagens mostra que as nanofibras apresentam uma elevada densidade de cobertura pelo polímero MEO₂MA-co-NAS. A alta eficiência de imobilização das cadeias de polímero nas fibras não impede a presença de algumas áreas de nanofibras não cobertas (a verde na imagem da sobreposição).



Figura 35 – Resultado da caracterização por microscopia confocal dos *scaffolds* termo-sensíveis. A vermelho a emissão de fluorescência do polímero, a verde a emissão de fluorescência das nanofibras e na imagem da direita o resultado da sobreposição das duas imagens.

Realizou-se a análise de colocalização de fluorescência nas nanofibras termo-sensíveis (figura 36). O estudo de colocalização de fluorescência compara a sobreposição de fluorescência para os mesmos pixéis de uma dada imagem. Dentro das linhas a branco nos gráficos de colocalização (figura 36-B e D) está representado a sobreposição no mesmo pixel de duas emissões fluorescentes, fora das linhas a branco está representado as emissões sem sobreposição. A análise da sobreposição e colocalização das imagens (figura 36) mostra que as nanofibras apresentam uma elevada densidade de cobertura pelo polímero MEO₂MA-Ly. A alta eficiência de imobilização das cadeias de polímero (a amarelo e vermelho) nas fibras não impede a presença de pequenas áreas de nanofibras não cobertas (a azul claro).



Figura 36 - Imagens obtidas por microscopia confocal de laser com as nanofibras de policaprolactona desalinhadas (A) e alinhadas (C) marcadas por Cy5 e cobertas com polímero MEO₂MA-co-NAS marcado com *Lucifer yellow*. A e C) Imagens obtidas da emissão em simultâneo dos dois corantes. B e D) Gráficos com os resultados da caracterização por colocalização das imagens à esquerda, a parte interior das linhas a branco representam as sobreposições no mesmo pixel das duas emissões, fora das linhas encontram-se a emissões sem sobreposição.

Ao observar-se que os pixéis a azul apresentam uma densidade menor quando comparados com os pixéis a amarelo e vermelho, significa que existe uma predominância da emissão fluorescente por parte do polímero marcado, e de uma boa eficiência de imobilização de polímero marcado nas nanofibras para as zonas em questão.

Caracterização dos *scaffolds* de policaprolactona termo-sensíveis alinhados e desalinhados por SEM (figura 37). Pela análise das imagens de SEM para ambos os tipos de *scaffolds* termo-sensíveis é possível observar a alteração na superfície das fibras em relação às nanofibras de policaprolactona sem polímero. A existência de rugosidades nas nanofibras indica que se encontram cobertas por polímero. Quanto à morfologia das nanofibras cobertas com polímero, não existe alteração da forma cilíndrica com a ligação de polímero, mas a superfície alterou-se de nanofibras de lisas para nanofibras rugosas.



Figura 37 - Imagens obtidas por SEM com diferentes ampliações para caracterização da morfologia das nanofibras desalinhadas e alinhadas de policaprolactona cobertas com polímero MEO₂MA. A,B e C) Nanofibras termo-sensíveis alinhadas às escalas 45x45µm, 15x15µm e 5x5µm respectivamente. D, E e F) Nanofibras termo-sensíveis desalinhadas às escalas 45x45µm, 15x15µm e 5x5µm respectivamente.

Os scaffolds de policaprolactona termo-sensíveis foram avaliados relativamente à alteração da sua superfície por estímulos térmicos (figura 38). Os scaffolds foram imersos primeiro em água fria e posteriormente em água quente durante 3 horas, deixando-se estes secar para posterior caracterização por AFM. Analisando as imagens de caracterização da alteração da superfície das nanofibras termo-sensíveis por AFM (figura 38), observou-se que a superfície das nanofibras termo-sensíveis se alterou pela aplicação de um estímulo térmico. Observa-se que após incubação em água fria a superfície das nanofibras termo-sensíveis é relativamente lisa, e que após incubação em água quente a superfície das nanofibras termo-sensíveis se torna um pouco rugosa. Devendo-se esta alteração à mudança da conformação das cadeias de polímero imobilizado na superfície das nanofibras.



Nanofibras de policaprolactona

Scaffolds termo-sensíveis após imersão em água a 10°C.

Scaffolds termo-sensíveis após imersão em água a 50°C.

Figura 38 - Caracterização por AFM da alteração da superfície das nanofibras de policaprolactona cobertas com polímero MEO₂MA por estímulos térmicos (dimensão de cada imagem 2x2 µm). A) Imagens modo amplitude b) Imagens modo fase.

4.4. Caracterização dos scaffolds termo-degradáveis

Nesta parte do trabalho serão apresentados os resultados da caracterização dos scaffolds de MEO₂MA/policaprolactona. Estes scaffolds foram preparados termo-degradáveis por electrospinning a partir de soluções 20% (w/w) de mistura dos polímeros em HFP, sendo que estas composições 90%MEO₂MA/10%PCL, misturas foram preparadas com as seguintes 75%MEO₂MA/25%PCL e 50%MEO₂MA/50%PCL. Usou-se como substrato lamelas circulares de vidro de 32mm para fixar estes scaffolds, tendo-se utilizado condições semelhantes à produção de nanofibras de policaprolactona.

Neste tipo de *scaffolds* pretende-se que a sua estrutura se degrade por um estímulo de temperatura, ou seja, que o polímero termo-sensível acima da sua temperatura de transição se mantenha na estrutura do *scaffold*, e abaixo da sua temperatura de transição se liberte da estrutura do *scaffold* e dissolva na solução, levando à degradação progressiva da estrutura do *scaffold* e leve consigo as células nele aderidas, ao contrário dos *scaffolds* termo-sensíveis que possuem uma estrutura permanente, alterando-se apenas o tipo de superfície das nanofibras com a temperatura.

Uma vez que estes scaffolds nunca foram estudados, e não se conhecia a sua estrutura após a síntese, caracterizaram-se por microscopia electrónica de varrimento e microscopia de força atómica em relação à sua topologia. De seguida caracterizaram-se em relação à velocidade de degradação por diminuição da temperatura do meio, e a estabilidade da sua estrutura quando expostos à temperatura de incubação das células de 37°C.

Foram produzidos e caracterizados *scaffolds* termo-degradáveis de 90%MEO₂MA/10%PCL, 75%MEO₂MA/25%PCL e 50%MEO₂MA/50%PCL. Na figura 39, é apresentada uma imagem da caracterização de um scaffold termo-degradável de 90%MEO₂MA/10%PCL por SEM e AFM. As imagens mostram que a superfície é plana, aparentando algumas irregularidades no filme, que poderão ser indicadoras da existência de algum tipo de estrutura interna do filme.



Figura 39 - Caracterização por SEM à escala de 500×500µm e AFM da estrutura de um scaffold termo-degradável de 90%MEO₂MA/10%PCL à escala de 87×87µm.

Realizou-se um teste de degradação, com o objectivo de simular as condições de cultura e de libertação celular que estes *scaffolds* serão sujeitos. Para tal nove destes *scaffolds* foram incubados em água a 37°C durante 7 dias, retirando-se aos dias 1, 4 e 7 de incubação duas amostras para caracterização da degradação e para caracterização da estabilidade ao longo da cultura, sendo colocada a secar no excicador. As duas amostras para degradação foram colocadas em água fria a 10°C em agitação leve, durante 1 e 2 horas. As amostras no final foram secas no excicador.

A velocidade de degradação dos *scaffolds* foi constante ao longo dos dias de incubação, e a sua estrutura manteve-se ao longo dos sete dias de incubação a 37°C. Na figura 40 são apresentados os resultados dos testes de estabilidade e degradação dos *scaffolds* termo-degradáveis de 90%MEO₂MA/10%PCL por SEM.

Observou-se que a estrutura dos *scaffolds* não se alterou com o tempo de incubação (figura 40- A, B e C). Relativamente à degradação destes por diminuição da temperatura, observa-se que a estrutura do *scaffold* foi completamente degradada após imersão em água fria a 10°C (figura 40 - D, E e F), observando-se uma degradação superior após duas horas (figura 40 - G, H e I).

É possível também observar o aparecimento de malhas fibrosas de policaprolactona após a degradação, resultantes da dissolução do polímero MEO₂MA no meio pela diminuição da temperatura e pela permanência destas redes após degradação.



Figura 40 - Caracterização da estabilidade e degradação do filme de 90%MEO₂MA/10%PCL por SEM. A, B e C) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 1 dia em água a 37°C às escalas de 95×95µm. D,E e F) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 1 hora em água a 10°C às escalas 140×140µm, a 140×140µm e 50×50µm respectivamente. G, H e I) Scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL após 2 horas em água a 10°C às escalas de 200×200µm, a 140×140µm e 50×50µm respectivamente.

Caracterizou-se por SEM e AFM (figura 41), os *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL relativamente à sua estrutura após produção por *electrospinning*.

Observou-se que a superfície deste tipo de scaffold é rugosa e muito porosa, aparentando ser um filme de polímero poroso. Observa-se o aparecimento de estruturas internas no filme que aparentam ser fibras cobertas por polímero, podendo-se antever pelo resultado dos *scaffolds* anteriores que existe uma estrutura completamente coberta por polímero no scaffold.



Figura 41 - Caracterização da superfície dos *scaffolds* termo-degradáveis de 75% MEO₂MA/25%PCL por SEM e AFM. A e B) Superfície do scaffold de 75% MEO₂MA/25%PCL às escalas de 500×500µm e 270×270µm respectivamente. C e D) Caracterização da superfície do scaffold por AFM pelo modo amplitude.

Na figura 42 são apresentados os resultados dos testes de degradação e de estabilidade dos *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL por SEM. Observou-se também nestes *scaffolds* que a velocidade de degradação foi constante após imersão em água fria, e que a sua estrutura se manteve ao longo dos sete dias de incubação a 37°C.

Observou-se que a estrutura dos *scaffolds* não se alterou com o tempo de incubação de 7 dias a 37°C (figura 42 - A, B e C). Relativamente à degradação por diminuição da temperatura pode afirmar-se que a estrutura do *scaffold* foi parcialmente degradada após imersão destes em água a 10°C, existindo uma maior degradação após as duas horas (figura 40 - G, H e I).

O aparecimento de estruturas resultantes da dissolução do polímero MEO₂MA no meio pela diminuição da temperatura, aparentam ser malhas fibrosas entrelaçadas de policaprolactona, e da permanência destas redes após degradação.



Figura 42 - Caracterização da estabilidade e degradação dos *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL por SEM. A, B e C) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 1 dia em água a 37°C às escalas de 90×90µm respectivamente. D, E e F) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 1 hora em água a 10°C às escalas de 200×200µm,100×100µm e 50×50µm respectivamente. G, H e I) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 2 horas em água a 10°C às escalas de 200×200µm,100×100µm e 20×20µm respectivamente.

Na figura 43, estão caracterizados os scaffolds de 50%MEO₂MA/50%PCL por SEM e AFM após produção por *electrospinning*. Observa-se a produção de fibras neste tipo de scaffold termo-degradável com diâmetros próximos de 1µm, de forma cilíndrica e superfície lisa.



Figura 43 - Caracterização da superfície dos *scaffolds* termo-degradáveis de 50% MEO₂MA/50%PCL por SEM e AFM. A) Scaffold de 50% MEO₂MA/50%PCL às escalas de 110×110µm, 22×22µm e 11×11µm respectivamente. D,E e F) Caracterização da superfície do scaffold 50% MEO₂MA/50%PCL por AFM pelo modo topografia as escalas 100×100µm, 50×50µm e 25×25µm respectivamente.

Caracterização por SEM (figura 44), dos *scaffolds* termo-degradáveis de 50%MEO₂MA/50%PCL após os testes de estabilidade e degradação.

Quanto à caracterização da estabilidade e degradação dos *scaffolds* termo-degradáveis de 50%MEO₂MA/50%PCL por SEM, observou-se que a estrutura dos *scaffolds* não se alterou com o tempo de incubação de 7 dias a 37°C (figura 44 – A a C). Relativamente à degradação destes *scaffolds* por diminuição da temperatura pode observar-se que a estrutura do scaffold permanece intacta após imersão destes em água fria a 10°C, observando-se apenas uma degradação superficial pelo aparecimento de cavidades nas fibras dos *scaffolds* após uma e duas horas de degradação (figura 44 - D a I).

Observa-se o aparecimento pequenas cavidades, pela dissolução das moléculas de polímero no meio com a diminuição da temperatura abaixo da temperatura de LCST do polímero MEO₂MA.



Figura 44 - Caracterização da estabilidade e degradação dos *scaffolds* de 50%MEO₂MA/50%PCL por SEM. A) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 1 dia em água a 37°C a 18×18µm. B) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 4 dias em água a 37°C a 10×10µm. c) Scaffold de 50%MEO₂MA/50%PCL após 7 dias em água a 37°C a 4×4µm. D,E e F) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 1 hora em água a 10°C a 10×10µm, 10×10µm e 5×5µm respectivamente. G,H e I) Scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL após 2 horas em água a 10°C a 10×10µm, 10×10µm e 4×4µm respectivamente.

Quanto à caracterização da estrutura dos *scaffolds* termo-degradáveis de MEO₂MA/PCL, observou-se para o scaffold de 90%MEO₂MA/10%PCL uma estrutura semelhante a um filme, para o scaffold de 75%MEO₂MA/25%PCL semelhante a um filme poroso e por último nos *scaffolds* de 50%MEO₂MA/50%PCL fibras com dimensões próximas de 1µm e uma topologia semelhante aos *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona caracterizados anteriormente.

Relativamente à estabilidade dos *scaffolds* termo-degradáveis em soluções aquosas, não se observaram alterações na sua estrutura após 7 dias de incubação em água quente. Tal facto indica que os *scaffolds* termo-degradáveis conseguem suportar durante pelo menos 7 dias uma cultura celular sem alterar a sua estrutura.

Quando se alterou a temperatura do meio dos *scaffolds* termo-degradáveis para uma temperatura abaixo da LCST do polímero de MEO₂MA, observou-se uma alteração significativa da estrutura dos *scaffolds* de 90%MEO₂MA/10%PCL e 75%MEO₂MA/25%PCL, pela alteração da sua estrutura inicial de uma forma acentuada. Este fenómeno de degradação da estrutura do *scaffold* poderá ser utilizado para que as células adiram neste e sejam forçadas a ficar em solução após diminuição da temperatura do meio. Quanto à degradação da estrutura dos *scaffolds* de 50%MEO₂MA/50%PCL, manteve-se a sua estrutura durante os testes de degradação, revelando apenas o aparecimento de cavidades nas fibras após a incubação destas em água fria.

4.5. Resultados da proliferação e libertação de células nos scaffolds

4.5.1. Cultura de células mesenquimais com scaffolds termo-sensíveis

Realizaram-se testes com células mesenquimais após a produção e caracterização dos scaffolds com o objectivo de testar a adesão, proliferação e libertação celular nos materiais desenvolvidos.

As células escolhidas para testar os *scaffolds* desenvolvidos foram as células mesenquimais, pela sua capacidade de aderir e crescer em diversos tipos de substratos. Para tal por cada experiência efectuada realizou-se uma expansão de células mesenquimais em frascos-T, durante um período de tempo variável para se obter uma quantidade de células relevante para a experiência com os *scaffolds*. Obtido o número de células desejado, realizou-se a extração das células dos frascos-T por métodos enzimáticos, e realizou-se a recuperação das células dos extractos por centrifugação. De seguida solubilizaram-se as células num volume conhecido e calculou-se a densidade celular presente nesse volume.

Antes da cultura de células realizou-se previamente a preparação dos *scaffolds* termosensíveis em placas de cultura de adesão celular ultra baixa e a incubação com antibiótico nos *scaffolds* durante 3 horas a 37°C. Após esses passos depositaram-se as células mesenquimais nos *scaffolds* termo-sensíveis, realizando-se uma pré-incubação dos *scaffolds* a 37°C durante 30 minutos para permitir que as células adiram à superfície destes. Após este período adicionou-se meio de cultura aos *scaffolds* e incubaram-se a 37°C, analisando-se em dias específicos o número de células presentes (estudos de proliferação) pelo método indirecto de quantificação celular por *Alamar blue*.

A libertação de células dos *scaffolds* termo-sensíveis foi realizada baixando a temperatura do meio celular para 10°C e mantendo-se a temperatura durante 1 hora, agitando-se a placa manualmente durante 2 minutos a cada 10 minutos. Após esse período, centrifugaram-se as soluções celulares e solubilizaram-se os precipitados num volume conhecido, realizando-se de seguida a contagem das células libertadas.

Foram cultivadas 10000 células mesenquimais em triplicados de *scaffolds* de nanofibras termo-sensíveis desalinhados para os meios *DMEM*+10%FBS, *Xenofree* e *Xenofree* com *Cell start*TM durante 9 dias, realizando-se estudos de proliferação e libertação celular nos dias 7 e 9 do tempo de cultura (figura 45). Observou-se adesão e crescimento celular em todos os *scaffolds* cultivados nos três meios de cultura utilizados. Relativamente ao crescimento celular nos *scaffolds* cultivados em meio *Xenofree* com *Cell start*TM observou-se uma proliferação substancial em relação aos *scaffolds* termo-sensíveis cultivados para os meios *DMEM*+10%FBS e *Xenofree*.



Figura 45 - Gráfico com o número de células contadas por *Alamar blue* nos *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona termosensíveis desalinhados para os dias 7 e 9 nos meios de cultura *DMEM*+10%FBS a azul, *Xenofree* a verde e *Xenofree* com *cell start*TM a azul.

Todos os *scaffolds* termo-sensíveis apresentaram crescimentos celulares nestes acima da densidade celular cultivada inicialmente após 7 dias de cultura, indicando que estes *scaffolds* conseguiram suportar as células mesenquimais e induzi-las a proliferar. Relativamente às densidades celulares obtidas para este dia de cultura, observou-se que no meio *DMEM*+10%FBS quantificou-se uma menor densidade celular com aproximadamente 14000 células mesenquimais, seguindo-se os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* com uma densidade celular de 30000 células mesenquimais, e por último os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* com *cell start*TM com uma densidade celular de 53000 células mesenquimais.

Observou-se uma densidade celular ligeiramente inferior ao fim de 9 dias de cultura comparando com a densidade celular presente nos *scaffolds* ao dia 7. Tal facto pode ser um indicador de morte celular nos *scaffolds* após os 7 dias de cultura, ou que as células cultivadas nestes *scaffolds* durante o período de pré-incubação possam não ter aderido tão eficazmente ao *scaffold*, uma vez que estes resultados provêem de placas de cultivo diferentes.

Quanto ao ensaio de proliferação realizado nos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados, pode afirmar-se que o resultado foi promissor, com bons indicadores de adesão e crescimento celular ao longo do tempo de cultura, tendo-se registado densidades celulares que ultrapassam os valores de densidades celulares para os mesmos dias de cultura em *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona. Uma vez que a adesão nos *scaffolds* de policaprolactona se situa entre os 10% e os 30%, e que

foram cultivados inicialmente 10000 células, no melhor caso aderiram aos *scaffolds* 3000 células. Analisando as densidades celulares obtidas ao fim de 7 dias, foram registadas para os meios *Xenofree* uma multiplicação celular teórica de 10, e para o meio *Xenofree* com *Cell start*TM uma multiplicação celular teórica de 17.

Realizou-se um teste de libertação celular nestes *scaffolds*, por diminuição da temperatura do meio para 10°C durante 1 hora. Analisaram-se os extratos celulares, não se tendo conseguido contar um número relevante de células. Tal facto significa que a tentativa de libertação celular por diminuição da temperatura nestes *scaffolds* não foi eficaz.

Para avaliar este resultado foi realizada a fixação das células nos *scaffolds* com Paraformaldeido (PFA) e etanol, realizando-se a caracterização por SEM (figura 46). Nas imagens de SEM dos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados observa-se que as células mesenquimais cultivadas construíram uma matriz extracelular muito densa, resultando na total cobertura das nanofibras termosensíveis. Tal facto é um indicador de que o *scaffold* proporcionou uma estrutura de matriz extracelular muito boa para as células, resultando em crescimentos celulares substanciais e de uma matriz celular muito densa. Como resultado as células não estão em contacto directo com as nanofibras termo-sensíveis, mas sim com a matriz extracelular segregada por estas e a alteração da superfície do scaffolds não foi sentida pelas células.



Figura 46 - Caracterização de SEM dos *scaffolds* termo-sensíveis de nanofibras desalinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e ensaio de libertação de células. A a F) *Scaffolds* termo-sensíveis após 9 dias de cultura e ensaio de libertação de células a 21×21µm, 42×42µm, 50×50µm, 42×42µm, 220×220µm e 42×42µm respetivamente.

Na figura 47, estão representados os resultados de proliferação celular realizados scaffolds termo-sensíveis alinhados em diferentes meios de cultura. Analisando o gráfico obtido do crescimento de células mesenquimais em *scaffolds* alinhados termo-sensíveis, observou-se que existiu adesão e crescimento celular em todos os *scaffolds* cultivados nos três meios de cultura utilizados. Relativamente ao crescimento celular nos *scaffolds* cultivados em meio *Xenofree* com *cell start*TM



observou-se uma proliferação substancial em relação aos *scaffolds* termo-sensíveis cultivados para os meios *DMEM*+10%FBS e *Xenofree*.

Figura 47 - Gráfico representativo da proliferação celular nos *scaffolds* termo-sensíveis de nanofibras alinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA durante 9 dias para os meios de cultura *DMEM*+10%FBS a azul, *Xenofree* a vermelho e Xenofree com *cell start*TM a verde.

Observou-se após 1 dia de cultura de células mesenquimais nos *scaffolds* termo-sensíveis alinhados, que a adesão média nestes para todos os meios de cultura foi de 40%.

O número de células nos *scaffolds* duplicou no quarto dia de cultura em relação ao dia 1 para uma média de 8000 células, observando-se um crescimento semelhante nos *scaffolds* termosensíveis para os três meios de cultura.

Observou-se um aumento substancial de densidade celular nos *scaffolds* cultivados em meio Xenofree com *cell start*TM após 9 dias de cultura, com uma triplicação do número celular em relação à densidade celular do dia 4. Relativamente aos *scaffolds* cultivados nos meio *DMEM*+10%FBS e *Xenofree* observou-se um comportamento de crescimento celular muito semelhante, tendo neste caso ultrapassado ligeiramente o número celular cultivado inicialmente ao fim de 9 dias de cultura.

Relativamente à multiplicação celular registada nos *scaffolds* termo-sensíveis alinhados, estes ficaram abaixo dos resultados obtidos nos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados, tendo-se registado ao fim de 9 dias de cultura uma multiplicação celular de 3 para os *scaffolds* cultivados em *DMEM*+10%FBS e *Xenofree*, e uma multiplicação celular de 5.5 para os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* com *cell start*TM.

Nos *scaffolds* termo-sensíveis alinhados foi registada uma proliferação inferior à registada nos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados, estando este resultado relacionado com o facto do nicho celular das células mesenquimais possuir uma estrutura de matriz extracelular bastante desorganizada como é o caso dos *scaffolds* desalinhados.^{1,6,8}

Realizou-se um teste de libertação celular nestes *scaffolds*, pela diminuição da temperatura do meio para 10°C durante 1 hora. Não se conseguindo contar um número relevante de células

libertadas em todos os *scaffolds*. Tal facto significa que a tentativa de libertação celular por diminuição da temperatura nestes *scaffolds* não foi eficaz.

Na figura 48, é possível observar após a tentativa de libertação celular que as células mesenquimais permaneceram no *scaffold*. Na imagem de microscopia óptica dos *scaffolds* termosensíveis alinhados após tentativa de libertação celular, pode ver-se que no geral as células permaneceram nos *scaffolds* após a diminuição da temperatura do meio, observando-se que a alteração da superfície das nanofibras pela temperatura, não resultou na libertação destas ou que o estímulo que o polímero exerceu sobre estas não foi suficiente.



Figura 48 - Observação dos *scaffolds* termo-sensíveis de nanofibras desalinhadas de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e do ensaio de libertação de células pelo microscópio óptico. A e B) *Scaffolds* termo-sensíveis de nanofibras de policaprolactona cobertos com MEO₂MA após 9 dias de cultura e ensaio de libertação de células a escalas de 500×500µm respectivamente.

Quanto aos resultados das culturas celulares realizadas sobre os *scaffolds* termo-sensíveis alinhados e desalinhados, observou-se um crescimento celular em todos os *scaffolds* cultivados, traduzindo-se numa boa capacidade de adesão e proliferação das células nos *scaffolds* desenvolvidos. Relativamente às diferenças de crescimento celular entre os *scaffolds* termo-sensíveis, foi registado um crescimento celular superior nos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados quando comparado com o registado nos *scaffolds* termo-sensíveis alinhados, resultando do facto de as células mesenquimais multiplicarem-se melhor numa estrutura tridimensional desorganizada quando comparado com o crescimento celular numa estrutura tridimensional organizada, devido ao seu nicho celular possuir uma estrutura tridimensional desalinhada.

Nos resultados obtidos em relação à libertação celular nos *scaffolds* termo-sensíveis não foi possível quantificar um número de células relevantes para este estudo durante a experiência. Este resultado indica que o estimulo efectuado pelos *scaffolds* sobre as células por diminuição da temperatura não foi suficiente para que estas se libertassem.

4.5.2. Cultura de células mesenquimais com scaffolds termo-degradáveis

Antes da cultura de células realizou-se a preparação dos scaffolds e a cultura de células de acordo com o protocolo descrito nos materiais e métodos. Realizou-se primeiramente a cultura de 30000 células mesenquimais em triplicados de *scaffolds* termo-degradáveis de

75%MEO₂MA/25%PCL para os meios *DMEM*+10%FBS e *Xenofree* durante 7 dias, realizando-se estudos de proliferação e libertação celular nos dias 1, 4 e 7 do tempo de cultura (figura 49).



Figura 49 - Gráfico representativo da proliferação celular nos *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO2MA/25%PCL durante 7 dias para os meios de cultura *Xenofree* a azul e *DMEM*+10%FBS a vermelho.

Registou-se uma adesão de 13% nos *scaffolds* em *Xenofree* e 25% nos *scaffolds* cultivados em *DMEM*+10%FBS após 1 dia de cultura. Esta diferença deve-se ao facto de as células mesenquimais cultivadas terem sido expandidas em meio *DMEM*+10%FBS, originando alguma morte celular ou pouca aptidão nas células para que estas adiram ao scaffold quando cultivadas em *Xenofree*.

O número de células nos *scaffolds* não se alterou significativamente nos *scaffolds* cultivados em *DMEM*+10%FBS após 4 dias de cultura, significando que as células continuam a morrer mas existem ainda células a multiplicar-se, o que conseguiu equilibrar a densidade celular com o avanço do tempo de cultura. Para os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* após 4 dias de cultura as células continuam a morrer a uma taxa superior à multiplicação celular existente, o que significa que a maioria das células não se está a adaptar à mudança de meio ou ao *scaffold*.

Observou-se após 7 dias de cultura um ligeiro aumento da densidade celular nos *scaffolds* cultivados em meio *DMEM*+10%FBS que se traduz numa diminuição da morte celular e um aumento do número de células a multiplicar-se no scaffold. Para os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* continuase a observar morte celular no *scaffold* ao longo do tempo por não revelarem capacidade de adaptação ao meio ou ao *scaffold*.

Realizou-se um teste de libertação celular nestes *scaffolds*, pela diminuição da temperatura do meio para 10°C durante 1 hora. Na figura 50, é apresentado a relação entre o número de células quantificadas por *Alamar blue* no ensaio de proliferação e o número de células contadas após o ensaio de libertação para os diferentes meios.



Figura 50 - Gráficos do número de células num dado dia da cultura de células versus número de células libertado por temperatura nos *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL em meio *DMEM*+10%FBS a azul e *Xenofree* a verde.

Registou-se no primeiro dia de cultura uma percentagem média de libertação de 70% nos *scaffolds*, no quarto dia de cultura uma média de libertação de 60% e no sétimo dia de cultura uma libertação média de 50%.

Observou-se que os *scaffolds* cultivados em *Xenofree* obtiveram uma taxa de libertação superior quando comparado com os *scaffolds* em *DMEM*+10%FBS. Devendo-se este resultado das células se encontrarem fragilizadas naquele meio e quando estrutura do scaffold se alterou levou a que as células fossem libertadas facilmente. Escolhe-se assim o comportamento dos *scaffolds* termo-degradáveis cultivados em DMEM+10%FBS como o comportamento padrão de libertação destes, com uma percentagem média de libertação para os três dias de 60%.

Realizou-se outro ensaio de proliferação e libertação celular com o objectivo de validar os resultados obtidos anteriormente nos *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL por temperatura. Cultivaram-se os *scaffolds* termo-degradáveis de 90%MEO₂MA/10%PCL, de 75%MEO₂MA/25%PCL e controlos com *scaffolds* de nanofibras de policaprolactona desalinhados. Utilizou-se o meio *Xenofree* em todos os *scaffolds*, tendo as células mesenquimais sido expandidas neste meio também. Relativamente aos métodos de libertação usados nesta experiência, foram usados os métodos usados anteriormente de libertação por temperatura e enzimáticos, com o objetivo de estabelecer uma comparação entre os dois e testar a sua eficácia. Os *scaffolds* termo-degradáveis e os controlos foram cultivados durante 7 dias, realizando testes de proliferação aos dias 1, 4 e 7 dias (figura 51).



Figura 51 - Gráfico da proliferação celular nos *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL a azul, 90%MEO₂MA/10%PCL a vermelho e controlo (PCL) a verde após 7 dias no meio de cultura *Xenofree*.

Observou-se uma adesão de 40% nos *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL (azul), 30% nos *scaffolds* de 90%MEO₂MA/10%PCL (vermelho) e 60% de adesão nos *scaffolds* de policaprolactona (verde) após 1 dia de cultura. Com este resultado confirma-se que a estrutura da matriz dos *scaffolds* de nanofibras (controlo) permite uma adesão superior, observando-se com a diminuição da estrutura no filmes termo-degradáveis a percentagem de adesão a diminuir.

Observou-se a existência de crescimento celular em todos os *scaffolds* cultivados ao fim de 4 dias de cultura, observando-se um crescimento superior para os *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL (azul).

No fim do tempo de cultura (dia 7), observou-se crescimento celular nos filmes de 90%MEO₂MA/10%PCL e um decréscimo da densidade celular nos restantes *scaffolds*. O decréscimo da multiplicação celular nestes *scaffolds* pode ser explicado por um estado de confluência celular nestes *scaffolds*, ou por condições no meio não favoráveis nos *scaffolds* 75%MEO₂MA/25%PCL e nos controlos de policaprolactona.

Quanto à multiplicação celular obtida nos *scaffolds*, registou-se uma multiplicação celular de 1.85 nos *scaffolds* termo-degradáveis de 75%MEO₂MA/25%PCL, 2.7 nos *scaffolds* termo-degradáveis de 90%MEO₂MA/10%PCL e 1.7 nos controlos com *scaffolds* de policaprolactona desalinhados ao fim de 7 dias de cultura. Observou-se que ambos os *scaffolds* termo-degradáveis obtiveram uma taxa de multiplicação celular superior à dos *scaffolds* de policaprolactona, tendo-se obtido uma multiplicação superior nos filmes de 90%MEO₂MA/10%PCL.

Realizou-se um teste de libertação celular nestes *scaffolds*, pela diminuição da temperatura do meio para 10°C durante 1 hora e por Accutase durante 7 minutos a 37°C. Para cada dia de libertação celular foi utilizada uma placa de cultura com *scaffolds* termo-degradáveis e controlos para o meio de cultura *Xenofree*, descartando-se de seguida as placas. Realizou-se a análise das soluções celulares, tendo-se conseguido contar células em todos os dias da cultura (figura 52). Os

valores indicados são uma relação entre o número de células quantificadas por *Alamar blue* no ensaio de proliferação e o número de células contadas após o ensaio de libertação. Observou-se uma libertação celular por diminuição da temperatura em todos os *scaffolds* termo-degradáveis durante os 7 dias de cultura, enquanto nos controlos de policaprolactona não se libertaram células por temperatura, como seria de esperar. Relativamente à libertação por Accutase (método enzimático) conseguiu-se libertar células mesenquimais nos *scaffolds* termo-degradáveis durante os 7 dias de cultura, enquanto nos controlos de policaprolactona não se conseguiu libertar células através deste método ao fim de 7 dias de cultura.





Quanto à percentagem de células que conseguiram ser libertadas após 1 dia de cultura, foi obtido para os *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL e de 90%MEO₂MA/10%PCL libertação total das células cultivadas pela diminuição da temperatura, sendo o valor inicial de células quantificado pelo método indirecto *Alamar Blue*. Relativamente à libertação de células por *Accutase* após 1 dia de cultura, conseguiu-se libertar 60% das células quantificadas por *Alamar Blue* nos *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL, e 25% das células contadas nos *scaffolds* de 90%MEO₂MA/10%PCL e 10% das células nos controlos de policaprolactona.

Conseguiu-se após 4 dias de cultura nos *scaffolds* de 75%MEO2MA/25%PCL e de 90%MEO2MA/10%PCL libertar 20% das células quantificadas por *Alamar Blue* por diminuição da temperatura. Relativamente à libertação de células por *Accutase* após 4 dias de cultura conseguiu-se libertar apenas 20% das células contadas nos *scaffolds* de 75%MEO2MA/25%PCL, 15% das células contadas nos *scaffolds* de 90%MEO2MA/10%PCL e 5% das células contadas nos controlos de policaprolactona.

Libertou-se após 7 dias de cultura nos *scaffolds* de 75%MEO2MA/25%PCL 10% das células quantificadas por *Alamar Blue* por diminuição da temperatura e 15% nos *scaffolds* de 90%MEO₂MA/10%PCL. Relativamente à libertação de células por *Accutase* após 7 dias de cultura

conseguiu-se libertar 5% das células contadas nos *scaffolds* de 75%MEO₂MA/25%PCL, 10% das células contadas nos scaffolds de 90%MEO₂MA/10%PCL e não se conseguiu libertar as células contadas nos controlos de policaprolactona.

Conclui-se que o método de libertação por temperatura revelou ser mais eficaz para libertar as células mesenquimais dos *scaffolds* termo-degradáveis do que o método enzimático. Verificou-se também que os métodos de libertação por temperatura e enzimáticos se revelaram menos eficazes com o aumento do tempo de cultura. Quanto aos controlos de policaprolactona, por métodos enzimáticos os resultados foram limitados, não ultrapassando uma média de 15% de libertação celular.

Como conclusão dos testes de proliferação e libertação realizados nos *scaffolds* termodegradáveis, obteve-se ao fim de duas experiencias uma taxa de libertação média de 50%, observando-se também bons resultados de proliferação celular quando comparados com os *scaffolds* de policaprolactona (controlo). Para os resultados de libertação celular pode concluir-se que o método de libertação por temperatura foi mais eficaz na libertação celular quando comparado com os métodos enzimáticos realizados.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Através dos conceitos apresentados no estado da arte, pretendeu-se produzir *scaffolds* que nos permitissem utilizar duas abordagens diferentes para recolher células estaminais. Numa das abordagens pretendeu-se que a estrutura do scaffold produzido não fosse alterada e se mantivesse intacta alterando apenas o tipo de superfície por temperatura. Utilizou-se este estímulo para que as células se libertassem juntamente com a sua matriz extracelular, dando-se a estes o nome de *scaffolds* termo-sensíveis. Na outra abordagem pretendia-se que a estrutura do scaffold se degradasse gradualmente por temperatura, libertando as células juntamente com a sua matriz extracelular, dando-se a estes o nome de *scaffolds* termo-degradáveis. Este trabalho teve como objectivo principal a preparação e caracterização destes *scaffolds* com resposta à temperatura, para cultura e libertação celular. Foram adquiridas todas as competências durante este trabalho em relação à produção dos dois tipos de *scaffolds*, caracterização e cultura de células estaminais.

Os objectivos deste trabalho foram cumpridos tendo sido produzidos e caracterizados *scaffolds* termo-sensíveis e termo-degradáveis. Relativamente aos resultados da caracterização, todos os dados obtidos confirmaram o tipo de resposta pretendida para cada tipo de scaffold produzido. Durante a caracterização dos *scaffolds* termo-sensíveis foi possível observar que a superfície destes se alterava com o aumento ou a diminuição da temperatura sem alteração da sua estrutura. Relativamente ao *scaffolds* termo-degradáveis foi possível observar que a diminuição da temperatura resultava na degradação da estrutura do scaffold, sendo que esta alteração era permanente.

Quanto aos resultados obtidos na cultura de células mesenquimais nos dois tipos de *scaffolds*, foi possível distingui-los em termos dos resultados de proliferação e libertação celular. Para os *scaffolds* termo-sensíveis, observou-se uma boa adesão e proliferação celular, obtendo-se melhores resultados para os *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados quando comparado com *scaffolds* termo-sensíveis alinhados. Demonstrando apenas pouca eficácia na libertação celular por estímulos de temperatura.

Nos *scaffolds* termo-degradáveis observou-se uma boa capacidade de libertação celular, com crescimentos celular bons mas não significativos quando comparado com o obtido nos *scaffolds* termo-sensíveis desalinhados.

Foram comparados dois métodos de libertação celular, um por temperatura e outro por uma enzima, onde o método de libertação celular por temperatura se revelou mais eficaz que os métodos enzimáticos convencionais.

Em relação ao objectivo dos *scaffolds* se tornarem uteis para cultura e libertação celular, os resultados mais promissores foram encontrados nos *scaffolds* termo-degradáveis, onde o crescimento celular foi satisfatório e a capacidade de libertação nos primeiros dias de cultura foram bastante satisfatórios, tendo em todos os casos ultrapassado os métodos enzimáticos convencionais de libertação celular. Tal facto permite afirmar que o uso de polímeros termo-sensíveis aumenta a eficácia de crescimento e libertação celular em *scaffolds* para cultura de células estaminais.

Os obstáculos a ultrapassar nos scaffolds termo-sensíveis serão os da optimização da cobertura das nanofibras de policaprolactona por polímero e a utilização de cadeias de polímero de maiores dimensões para que o estímulo sentido pelas células seja maior.

Quanto aos *scaffolds* termo-degradáveis, os obstáculos a ultrapassar serão os da optimização das concentrações de polímero que tornem o scaffold ainda mais eficaz. A preparação de nanofibras que demonstrem uma capacidade de degradação superior à verificada ou utilização de materiais que se degradem completamente por diminuição da temperatura.

Como desenvolvimento futuro nos parâmetros de cultura, os obstáculos a ultrapassar serão a optimização do processo em relação ao cultivo e método de libertação, utilização de outros tipos de células estaminais e testar a sua capacidade de promoção da diferenciação celular.

Referências bibliográficas

[1] R. Langer, J. Vacanti, "Tissue engineering", Science, Vol. 260, pp.920-926, 1993.

[2] J. Polak, "Advances in tissue engineering", Imperial College Press, 2008.ISBN-10 1-84816-182-4

[3] S. Liu, "Bioregenerative Engineering – Principles and Applications", John Wiley and Sons, 2007.

[4] Células estaminais, Sci-Therapies, 2014. [online] http://www.sci-therapies.info/mesenchymal-stem-cells.jpg

[5] Células estaminais, Crioestaminal, 2014. [online] http://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais/

[6] D. Kuraitis, C. Giordano, M. Ruel, A. Musarò, E. J. Suuronen, "*Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: A review of natural materials for therapeutic muscle regeneration*", *Biomaterials*, Vol.33, pp. 428-443, 2012.

doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.078

[7] M. Brizzi, G. Tarone, P. Defilippi, "Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche", Current Opinion in Cell Biology, vol. 24, pp.645–651, 2012.
 Doi: 10.1016/j.ceb.2012.07.001

 [8] T. Dvir, B. Timko, D. Kohane, R. Langer, "Nanotechnological strategies for engineering complex tissues", Nature nanotechnology, Vol. 6, 2011.
 Doi: 10.1038/nnano.2010.246

[9] *Fischer* scientific, *Tissue* culture plates, 2014. [online] http://www.fishersci.com/ecomm/servlet/fsproductdetail_10652_3786782__-1_0

[10] GE Healthcare Life Sciences Rocking bioreactor systems, 2014 [online] http://www.gelifesciences.com

[11] STEMCELL Technologies Inc, Spinner flasks, 2014 [online] http://www.stemcell.com/en/Products/All-Products/StemSpan-Spinner-Flask.aspx

[12] J.Yang, M. Yamato, C. Kohno, A. Nishimoto, H. Sekine, F. Fukai, T. Okano, "*Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds*", *Biomaterials*, Vol.26, pp.6415-6422, 2005.
 doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.061

[13] I. Elloumi-Hannachi, M. Yamato, T. Okano, "*Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine*", *Journal of Internal Medicine*, Vol. 267, pp.54–70, 2010.

doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02185.x

K. Nagase, J. Kobayashi, T. Okano, "Temperature responsive intelligent interfaces for biomolecular separation and cell sheet engineering", J.R.Soc. Interface, Vol.6, pp. 293-309, 2009.
 doi: 10.1098/rsif.2008.0499.focus

 [15] Z. Tang, Y. Akiyama, T. Okano, "Temperature-Responsive Polymer Modified Surface for Cell Sheet Engineering", Polymers, Vol.4, pp.1478-1498, 2012.
 doi: 10.3390/polym4031478 [16] N. Alves, I. Pashkuleva, R. Reis, João F. Mano, "Controlling Cell Behavior Through the Design of Polymer Surfaces", small, Vol. 6, Nº 20, pp.2208–2220, 2010.
 DOI: 10.1002/smll.201000233

[17] Jun Kobayashi e Teruo Okano, "Thermoresponsive Cell Culture Surfaces Designed for Cell-Sheet-Based Tissue Engineering and Regenerative Medicine", Biomaterials Surface Science, 1º Edição, pp.491-510, 2013.

[18] M. Lutolf, A. Hubbell, "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering", Natural Biotechnology, Vol. 23, pp.47–55, 2005.

[19] C. Chai, K. Leong," *Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells*", *Mol. Ther.*, Vol.15, pp.467–480, 2007.

 [20] M. Woodruff, D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century", Progress in polymer science, Vol.35, pp. 1217-1256, 2010.
 doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

 [21] T. K. Dash, V. B. Konkimalla, "Polycaprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review", Journal of controlled release, Vol.158, pp.15-33, 2012.
 doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.064

 [22] C. Barnes et al.,"Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds", Advanced Drug Delivery Reviews, Vol.59, pp.1413–1433, 2007.
 Doi:10.1016/j.addr.2007.04.022

[23] Leal-Egaña, A. Díaz-Cuenca and A. Boccaccini, "Tuning of Cell-Biomaterial Anchorage for Tissue Regeneration", Advanced Materials, Vol. 25, pp.4049–4057, 2013.
 DOI: 10.1002/adma.201301227

[24] I. Elloumi-Hannachi, M. Yamato e T. Okano, "Cell sheet engineering: a unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine", Journal of internal medicine, Vol. 267, pp. 54-70, 2010.
Doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02185.x

 [25] H. Chang, Y. Wang, "Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds", Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials, InTechopen, 2011.
 ISBN: 978-953-307-663-8

[26] Q. P. PHAM, U. SHARMA, A. G. MIKOS, "*Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review*", *Tissue Engineering*, Vol.12, nº5, pp. 1197-1211, 2006.

[27] H. Liu, X. Ding, G. Zhou, P. Li, X. Wei, Y. Fan, "*Electrospinning of Nanofibers for Tissue Engineering Applications*", *Journal of Nanomaterials*, Vol. 2013, 2013. doi:10.1155/2013/495708

[28] N. Khan, "Applications of electrospun nanofibers in the biomedical field", Studies by Undergraduate Researchers at Guelph, Vol. 5, Nº2, pp. 63-73, 2012.

[29] L. Tseng, P. Mather, J. Henderson, "Shape-memory-actuated change in scaffold fiber alignment directs stem cell morphology", Acta Biomaterialia, Vol. 9, pp.8790–8801, 2013.
 Doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.043

[30] S. Agarwal, J. Wendorff, A. Greiner, "Use of electrospinning technique for biomedical applications", Polymer, Vol. 49, pp.5603–5621, 2008.

[31] Hennessy, et al., "Mesenchymal Stem Cell Responses to Bone-Mimetic Electrospun Matrices Composed of Polycaprolactone, Collagen I and Nanoparticulate Hydroxyapatite", PLOS ONE, Vol. 6, e16813, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0016813

 [32] Y. Zhu, C. Gao, X. Liu, J. Shen, "Surface Modification of Polycaprolactone Membrane via Aminolysis and Biomacromolecule Immobilization for Promoting Cytocompatibility of Human Endothelial Cells", Biomacromolecules, Vol.3, pp.1312-1319, 2002.
 doi: 10.1021/bm020074y

[33] Y. Zhu, Z. Mao, H. Shi, C. Gao, "In-depth study on aminolysis of poly(ε-caprolactone): Back to the fundamentals", Sci. China Chem, Vol. 55, pp.2419–2427, 2012.

[34] J. Anderson et al., "The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction", Journal Biomedical Material Research, Vol. 93, pp.1151–1159, 2010.
 DOI: 10.1002/jbm.a.32609

[35] Gloria, et al. "Three-dimensional poly(ε-caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties", Biomacromolecules, Vol. 13, pp.3510–3521, 2012.

[36] V. Beachley, X. Wen, "Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length", Materials science and engineering C, vol.29, pp. 663-668, 2009. doi:10.1016/j.msec.2008.10.037

[37] C.. Bashuri, A. Ramamurthi, "Aligned electrospun scaffolds and elastogenic factors for vascular cell-mediated elastic matrix assembly", Journal of Tissue Engineering and Regenarative Medicine, Vol.6, pp. 673–686, 2012. doi: 10.1002/term.470

[38] M. Chen, P. Patra, M. Lovett, D. Kaplan, S. Bhowmick, "Role of electrospun fibre diameter and corresponding specific surface area (SSA) on cell attachment", Journal of Tissue Engineering and Regenarative Medicine, Vol.3, pp. 269–279, 2009.
 doi: 10.1002/term.163

[39] M. Chowdhury e G.Stylios, "Effect of Experimental Parameters on the Morphology of Electrospun Nylon6 fibres", International Journal of Basic & Applied Sciences, Vol. 10, №6, pp.70-78, 2010.

 [40] Q. Pham, U. Sharma, A. Mikos, "Electrospun Poly(E-caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration", Biomacromolecules, Vol. 7, pp.2796-2805, 2006.
 Doi: 10.1021/bm060680j
[41] R. Bagherzadeh, M. Latifi, L. Kong, "Three-dimensional pore structure analysis of polycaprolactone nanomicrofibrous scaffolds using theoretical and experimental approaches", Journal Biomedical Materials Research Part A, Vol. 2014:102A, pp.903–910, 2014.
 DOI: 10.1002/jbm.a.34736

[42] F. Song et al., "Fabrication of novel thermo-responsive electrospun nanofibrous mats and their application in bioseparation", European Polymer Journal, Vol.47, pp.1885–1892, 2011.
doi:10.1016/j.eurpolymj.2011.07.023

[43] F. Croisier et al., "Mechanical testing of electrospun PCL fibers", Acta Biomaterialia, Vol. 8, pp.218–224, 2012.
doi:10.1016/j.actbio.2011.08.015

 [44] R. Bagherzadeh, M. Latifi, L. Kong, "Three-dimensional pore structure analysis of polycaprolactone nanomicrofibrous scaffolds using theoretical and experimental approaches", Journal Biomedical Materials Research Part A, Vol. 2014:102A, pp.903–910, 2014.
 DOI: 10.1002/jbm.a.34736

[45] H. Okuzaki, K. Kobayashi, H. Yan, "*Non-woven fabric of poly(N-isopropylacrylamide) nanofibers fabricated by electrospinning*", *Synthetic Metals*, Vol.159, pp.2273–2276, 2009. doi:10.1016/j.synthmet.2009.07.046

[46] João F. Mano, "Stimuli-Responsive Polymeric Systems for Biomedical Applications", Advanced engineering materials, Vol.10, nº6, pp.515-527, 2008.
 doi: 10.1002/adem.200700355

[47] E. Cabane, X. Zhang, K. Langowska, C. Palivan, W. Meier, "Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine", Biointerphases, Vol.7, pp. 1-27, 2012.
doi: 10.1007/s13758-011-0009-3

[48] D. Simmons, "Phase and Conformational Behavior of LCST-Driven Stimuli Responsive Polymers", University of Texas, 2009

[49] M. Miguel, F.Ferreira, C. Baleizão, J. Farinha, "*Stimuli- Responsive Fiber Scaffolds For Stem Cell Culture*", Instituto Superior Técnico, 2013.

[50] C. Biglione et al., "Synthesis and characterization of thermoresposive nanogels of MEO₂MA and OEGMA using ultrasonication", XIV SLAP/XII CIP, 2014.

[51] Jean-François Lutz, "Polymerization of Oligo(Ethylene Glycol) (Meth)Acrylates: Toward New Generations of Smart Biocompatible Materials", Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, Vol. 46, 3459–3470, 2008.

DOI: 10.1002/pola.22706

[52] A. Duarte, J. Mano, R. Reis, "Thermosensitive polymeric matrices for three-dimensional cell culture strategies", Acta Biomaterialia, Vol. 7, pp.526-529, 2011.
 Doi:10.1016/j.actbio.2010.09.032

 [53] C. Alarcon, S. Pennadam and C. Alexander, "Stimuli responsive polymers for biomedical applications", Chem. Soc. Rev., 34, pp.276-285, 2005.
 DOI: 10.1039/b406727d

[54] Y. Li, J. Yang, J. Li, Y. Liu and W. Liu, "Revisiting differences in the thermo-responsive behavior of PNIPAAm and MEO2MA aqueous solutions", RSC Advances, Vol. 2, pp.2422–2426, 2012.
 DOI: 10.1039/c2ra01208a

[55] J. Rabolt et al., "Characterization of electrospun poly(N-isopropyl acrylamide) fibers", Polymer, Vol. 49, pp.4025–4032, 2008.
doi:10.1016/j.polymer.2008.06.018

[56] Peter Kingshott et al., "Thermo-Responsive Core-Sheath Electrospun Nanofibers from Poly (Nisopropylacrylamide)/Polycaprolactone Blends", Chem. Materials, Vol.22, pp.4214–4221, 2010. DOI:10.1021/cm100753r

[57] Stefaan C. De Smedt et al., "Stimuli-responsive electrospun fibers and their applications", Chem. Soc. Rev., Vol. 40, pp.2417–2434, 2011.DOI: 10.1039/c0cs00181c

[58] Hidetoshi Matsumoto et al., "Enhancing the Effect of the Nanofiber Network Structure on Thermoresponsive Wettability Switching", Langmuir, Vol.27, pp.14716–14720, 2011. doi:10.1021/la203396y

[59] W. Chuang, W. Chiu, "Thermo-responsive nanofibers prepared from poly(N-isopropylacrylamide-co-Nmethylol acrylamide)", Polymer, Vol. 53, pp. 2829-2838, 2012. doi:10.1016/j.polymer.2012.05.014

[60] L.H. Sperling, "Introduction to Physical Polymer Science", John Wiley and Sons, 4º edição, 2006. ISBN-13 978-0-471-70606-9

[61] R. Ebewele, "Polymer Science and Technology", CRC Press, 2000.ISBN 0-8493-8939-9

[62] G. Moad, E. Rizzardo, S. H. Thang, "*Living Radical Polymerization by the RAFT Process*," *Aust.J. Chem.,* Vol. 58, pp. 379-410, 2005.

[63] A. Favier, M. Charreyre, "*Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process*", *Macromolecular Rapid Connections*, Vol.27, pp.653-692, 2006.

 [64] C. Becer et al.," Libraries of Methacrylic Acid and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate Copolymers with LCST Behavior", Journal of polymer science Part A: Polymer Chemistry, Vol. 46, 7138–7147, 2008.
 DOI: 10.1002/pola.23018

[65] Altarawneh, S. Rawadieh, V. Gomes, "The influence of intermediate radical termination and fragmentation on controlled polymer synthesis via RAFT polymerization", Designed Monomers and Polymers, Vol. 17, № 5, pp.430–437, 2014. Doi: 10.1080/15685551.2013.867566

 [66] Adem Zengin, E. Yildirim, T. Caykara, "RAFT-Mediated Synthesis and Temperature-Induced Responsive Properties of Poly(2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylate) Brushes", Journal Polymer Science, Part A: Polymer Chem., Vol. 51, pp.954–962, 2012.
 DOI: 10.1002/pola.26460

[67] G. Moad, E.Rizzardo, S.Thang, "Living radical polymerization by the RAFT process", Australian Journal of Chemistry, Vol.58, pp.379-410, 2005.

[68] R. Rotzoll, D. H. Nguyen and P. Vana, "Controlled Radical Polymerization, Trithiocarbonates Containing Trimethoxysilyl Functionalities as Mediating Agents in Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Polymerization of Methyl Acrylate", Macromolecules, Vol.12, pp.275–276, 2009.

[69] Agilent technologies, "An Introduction to Gel Permeation Chromatography and Size Exclusion Chromatography".http://www.chem.agilent.com/Library/primers/Public/59906969EN%20GPC%20SEC%20Chrom %20Guide.pdf

ISBN 978-0-471-70907-7

[70] My Scope, Australian Microscopy and Microanalysis Research Facility, http://www.ammrf.org.au/myscope

[71] P. Eaton, P. West, "Atomic Force Microscopy", Oxford University Press, pp.256, 2010.

[72] P. Furrer, R.Gurny, "Recent advances in confocal microscopy for studying drug delivery to the eye: Concepts and pharmaceutical applications", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, vol.74, pp.33-40, 2010.

doi:10.1016/j.ejpb.2009.09.002

[73] J. Erie, J. Mclaren, S. Patel, "Confocal Microscopy in Ophthalmology", American Journal of Ophtalmogy, pp.639-646, 2009.doi:10.1016/j.ajo.2009.06.022

[74] J. Gatford, "A diagram of the electrospinning process showing the onset of instability", The New Zealand Institute for Plant and Food Research, 2008 http://en.wikipedia.org/wiki/Electrospinning#mediaviewer/File:Electrospinning_Diagram.jpg

[75] Elahi MF, Lu W, Guoping G, Khan F, "Core-shell Fibers for Biomedical Applications-A Review", Journal of Bioengineer & Biomedical Science, 3:121, 2013. doi:10.4172/2155-9538.1000121

[76] J. Zhuang, M. Gordon, J. Ventura, L. Li, S. Thayumanavan, "*Multi-Stimuli Responsive Macromolecules and Their Assemblies*", *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 42, pp.7421-7435, 2013. DOI: 10.1039/C3CS60094G

[77] *MEO*₂*MA Chemical structure*, Sigma, 2014. [online] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure8/180/mfcd00059330.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00059330-large.png

[78] Controlled radical polymerization guide, Aldrich Materials Science, 2014. [online] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Brochure/1/controlled-radical-polymerization-guide.pdf

[79] *Raft agent*, Sigma, 2014. [online] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure6/013/mfcd11040288.eps/_jcr_content/renditions/mfcd11040288-large.png

[80] Cy5 amine, Lumiprobe, 2014. [online] http://www.lumiprobe.com/img/p/structure/cy5-amine.gif

[81] *Lucifer yellow*, Sigma, 2014. [online] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/structure3/122/mfcd00006922.eps/_jcr_content/renditions/mfcd00006922-medium.png

[82] C. Frantz, K. Stewart, V M. Weaver,"*The extracellular matrix at a glance*", Journal of cell science, Vol. 123, pp. 4195-4200, 2010.