



**Alicia Viviana Prata
Alves**

**Electrically stimulated collagen films for tissue
growth**

**Filmes de colagénio eletricamente estimulados
para crescimento de tecidos**



**Alícia Viviana Prata
Alves**

**Electrically stimulated collagen films for tissue
growth**

**Filmes de colagénio eletricamente estimulados
para crescimento de tecidos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica das Doutoradas Paula Maria Lousada Silveirinha Vilarinho e Maria Helena Vaz Fernandes, Professoras Associadas do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família por todo o apoio prestado.
Especialmente às minhas avós e tia, que já não podem partilhar este momento
comigo.

o júri

Presidente

Prof. ^a Doutora Maria Elisabete Jorge Vieira Costa
Professora auxiliar do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

Prof. ^a Doutora Maria Ascensão Ferreira Silva Lopes
Professora auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Prof. ^a Doutora Paula Maria Lousada Silveirinha Vilarinho
Professora associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (Orientadora)

agradecimentos

O desenvolvimento de um trabalho não se baseia apenas num conjunto de atividades desenvolvidas individualmente, mas sim por diversos contributos de diversas naturezas. Desta forma quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos:

Às minhas orientadoras, Prof. Dra. Paula Vilarinho e Prof. Dra. Maria Helena Fernandes pela confiança depositada no meu trabalho e apoio dado.

À Prof. Dra. Odete de Cruz e Silva pela colaboração proporcionada e por todos os meios disponibilizados.

À Nathalie Barroca pela preciosa ajuda dada durante o desenvolvimento deste projeto, bem como a força dada quando a motivação estava nos seus picos mais baixos e por todos os bons momentos passados durante este tempo.

À Marisa Costa por todos os ensinamentos, aprendizagens, dicas, chamadas de atenção e todos os conselhos dados e a chamada à razão quando a motivação era pouca.

À Ana Roque pela incansável ajuda, paciência e todos os ensinamentos proporcionados.

À Doutora Joana Guimarães e ao Eng^o Artur Sarabando pela preciosa ajuda dada nas medidas dos ângulos de contacto.

Ao Sebastian Zlotnik pela ajuda dada com a microscopia de força atómica.

Às engenheiras Celeste Azevedo e Marta Ferro pela eficiência e constante disponibilidade.

Aos meus colegas de laboratório pelo bom ambiente de trabalho criado e por todos os conselhos dados e aprendizagens realizadas.

Aos meus colegas do mestrado pelas convívências, experiências e ensinamentos partilhados.

A todos os meus amigos, Cátia Ferreira, Nathalie Barroca, Priscila Melo, Caroline Teixeira, Carla Lopes, Beatriz Moura, Sónia Carvalho, Elisabete Nascimento, que sempre me apoiaram e proporcionaram bons momentos que jamais serão esquecidos.

Às minhas irmãs pela paciência e motivação que me deram.

Sobretudo quero agradecer aos meus pais por me terem disponibilizado esta oportunidade e experiência enriquecedora, além do incansável apoio, compreensão, amor, carinho e todas as oportunidades prestadas.

palavras-chave

Colagénio tipo I, Piezoelectricidade, Polarização, Molhabilidade, Rugosidade, Morfologia e Adesão celular; Células hOB e MG-63

resumo

Ao longo dos últimos anos tem-se tornado evidente que em alguns casos os biomateriais devem ser mais do que meros suportes temporários para o crescimento de novos tecidos, podendo intervir ativamente no processo de regeneração. O facto de o fenómeno piezoelectrico estar associado à reparação óssea, foi uma das principais motivações para a procura de materiais com características piezoelectricas, como potenciais indutores da regeneração de tecidos. Deste modo, os materiais piezoelectricos têm captado, nos últimos anos, a atenção dos investigadores, para a medicina regenerativa. O objetivo deste trabalho foi a preparação, caracterização e investigação do efeito da polarização dos filmes de colagénio tipo I na morfologia e adesão das células hOB e MG-63. O colagénio tipo I foi o material piezoelectrico escolhido para a realização deste trabalho, uma vez que, para além de ser a principal proteína constituinte do organismo humano, se pensa que as suas propriedades piezoelectricas estejam envolvidas na autorreparação óssea. Foram preparados filmes de colagénio tipo I pelo método de *drop-casting* tendo sido posteriormente polarizados a 40 °C pelo método da descarga de Corona, carregando desta forma os filmes positiva e negativamente. Para uma melhor análise dos filmes obtidos foram realizadas primeiramente caracterizações aos filmes relativamente à sua morfologia, estrutura, rugosidade e comportamento térmico, tendo posteriormente sido analisados filmes sem submissão à polarização e filmes polarizados, relativamente à sua molhabilidade e composição estrutural com o principal objetivo de analisar se existe alguma alteração induzida pela polarização dos mesmos. Estes estudos foram seguidos dos estudos celulares preliminares por recurso a duas linhas celulares: as hOB que são células osteoblásticas humanas e as MG-63, uma linha tumoral proveniente de osteossarcomas.

Os filmes de colagénio, com uma espessura aproximada de 2 µm, revelam rugosidades micrométricas, geralmente favoráveis às atividades celulares, com rugosidades médias de 111 ± 20 nm. A análise térmica evidencia um pico endotérmico largo aos aproximadamente 62 °C, indicando a existência de moléculas com estabilidades/ comportamentos térmicos diferentes. As medidas de ângulos de contacto revelaram que todas as superfícies analisadas se encontram no domínio hidrofílicos, tendo-se no entanto registado melhorias na molhabilidade dos filmes de colagénio submetidos à polarização. A análise da composição estrutural através da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) mostrou a presença das bandas típicas para o colagénio tipo I, tendo sido detetada a amida A, I, II e III, para todos os grupos de filmes analisados.

Nos estudos celulares preliminares realizados verificou-se que para ambas as linhas celulares (hOB e MG-63), as células em contacto com as superfícies polarizadas apresentam um maior número de filamentos de F-actina bem orientados, o que indica a existência de uma forte interação das células com este tipo de superfície. As contagens celulares apontam para uma preferência das hOB relativamente aos filmes de colagénio (-), enquanto que, não foram detetadas diferenças significativas na adesão celular para nenhum dos grupos de filmes analisados para o caso da linha celular MG-63.

keywords

Collagen type I, Piezoelectricity, Polarization, Wettability, Roughness, Cell Morphology and Adhesion, Cell types hOB and MG-63

abstract

Over the past few years it has become apparent that in some cases the biomaterials should be more than temporary supports for the growth of new tissues and must intervene actively during the regeneration process. The discovery of piezoelectricity and their involvement on the repair process in biological tissues, such as skin, tendon and bone, has led to the idea of using unique materials, such as materials that exhibit surface charges, as potential inducers for regenerative medicine.

The aim of this study lays on the preparation, characterization and subsequent analysis of the influence that polarization of type I collagen films has on cell morphology and adhesion. Type I collagen is the piezoelectric material selected for this work because besides being the most abundant protein in the body that plays a fundamental role in tissues and organs formation, it is thought that the piezoelectric properties of this protein could be related to the ability of bone self-repair. For this purpose collagen films were prepared by dip-casting method and subsequently macroscopically polarized at 40 ° C by Corona poling. In that way there were produced negatively and positively charged films. For a better understanding of the obtained films there were done characterizations regarding their morphology, structure, roughness and thermal behavior. Subsequently polarized and non-polarized films were analyzed in relation to their wettability and chemical composition with the main goal to detect possible changes induced by polarization. Preliminary cellular studies were conducted with two cell lines: a human osteoblastic cell type (hOB) and an osteosarcoma cell line (MG-63).

The obtained collagen films have a thickness of approximately 2 µm. The surface roughness measurements of the films show a micrometric roughness that generally is promising for cellular activities. The average roughness that was obtained is around 111 ± 20 nm. Thermal analyses show a broad endotherm peak at approximately 62 ° C representing a variability of molecules with different thermal stabilities. The contact angle measurements have shown that all analyzed surfaces are in the hydrophilic domain. However it was shown a significant improvement of the wettability for the polarized collagen films. Results of Fourier Transform InfraRed Spectroscopy (FTIR) analyses indicate the presence of the typical peaks for collagen type I FTIR spectra. It was detected the characteristic bands of amide A, I, II and III for all analyzed film groups.

In preliminary cellular studies it was found that for both cell lines (hOB and MG-63) the cells in contact with the polarized surfaces spread with cytoskeletal rearrangements of actin filaments being observed through the formation of stress fibers, which indicates the existence of a strong interaction between the cell and the charged surfaces. The cell counting indicates that the hOB cells prefer the negatively charged collagen films (-) while for the cell line MG-63 no significant differences were detected in cell adhesion between any of the analyzed films groups.

Índice

Índice de Imagens	iii
Índice de Tabelas	v
Abreviaturas	vii
Capítulo 1	1
1. Introdução e objetivos.....	3
1.1. Introdução	3
1.2. Objetivos	4
1.3. Estrutura da tese	6
Capítulo 2	7
2. Revisão Bibliográfica	9
2.1. Eletricidade associada ao meio biológico	9
2.2. Constituição do osso	10
2.2.1. Remodelação e reparação óssea	13
2.2.2. Piezoelectricidade no osso.....	15
2.3. Estimulação elétrica para a reparação de tecidos biológicos	17
2.3.1. Efeito piezoelétrico	18
2.3.2. Aplicações de materiais com propriedades piezoelétricos na engenharia de tecidos	20
2.4. Polímeros na engenharia de tecidos.....	28
2.4.1. Colagénio	30
2.4.2. Tipos do colagénio	31
2.4.3. Síntese e estrutura do colagénio tipo I.....	33
2.4.4. Principais aplicações e estudos realizados com o colagénio na área médica... ..	37
Capítulo 3	39
3. Metodologias e técnicas de caracterização	41
3.1. Preparação dos filmes finos de colagénio.....	41
3.2. Polarização dos filmes finos de colagénio	42
3.3. Técnicas de caracterização	44
3.3.1. Electroforese de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico	44
3.3.2. Calorimetria Diferencial de varrimento	45
3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento.....	46

3.3.4.	Microscopia de Força Atômica	47
3.3.5.	Medidas de ângulos de contacto	49
3.3.6.	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier	50
3.3.7.	Adesão celular nos filmes de colagénio polarizados	51
Capítulo 4	55
4.	Resultados e Discussão	57
4.1.	Caracterização macromolecular da solução precursora do colagénio por SDS-PAGE	57
4.2.	Comportamento térmico do colagénio.....	58
4.3.	Caracterização morfológica dos filmes de colagénio	60
4.4.	Molhabilidade dos filmes de colagénio	65
4.5.	Caracterização estrutural dos filmes de colagénio por espectroscopia de refletância total atenuada do infravermelho com transformada de Fourier.....	69
4.6.	Ensaio celulares.....	72
4.6.1	Estudos de morfologia e adesão celular nos filmes de colagénio polarizado	72
Capítulo 5	83
5.	Conclusões e trabalhos futuros	85
5.1	Conclusões.....	85
5.2	Trabalhos futuros.....	86
Capítulo 6	89
6.	Referências bibliográficas.....	91

Índice de Imagens

Figura 1: Esquema de organização dos grupos para o ensaio celular.	6
Figura 2- Experiências realizadas por Galvani.....	9
Figura 3- Estrutura do osso compacto	13
Figura 4- Processos intervenientes na reparação óssea após a ocorrência de uma fratura.	14
Figura 5- Remodelação óssea	15
Figura 6- Efeito piezoelétrico direto (a), através da aplicação de cargas de compressão e tração e efeito piezoelétrico inverso (b), através da aplicação de um campo elétrico ao material.....	18
Figura 7- Materiais que possuem um centro de simetria, que com a aplicação de uma tensão acabam por ser anulados os dipolos que se geram (materiais não piezoelétricos) e materiais que não possuem centro de simetria e que com a aplicação de uma tensão se gera uma polarização (materiais piezoelétricos)	19
Figura 8- Direção das tensões que afetam a polarização	19
Figura 9- Estrutura da <i>perovskite</i> característica dos óxidos que apresentam a fórmula química ABO_3	22
Figura 10- Estrutura do polifluoreto de vinidileno (PVDF).	25
Figura 11- Estrutura e constituição de uma α -hélice constituinte do colagénio.	33
Figura 12- Molécula de tropocolagénio do tipo I, em que as cadeias mais claras representam as cadeias $\alpha 1$ e a mais escura representa a cadeias $\alpha 2$	33
Figura 13- Formação do tropocolagénio e das fibrilhas de colagénio.....	34
Figura 14- Organização das fibrilhas de colagénio representando as bandas periódicas características das fibrilhas do colagénio tipo I.	35
Figura 15- Formação das fibras de colagénio, a partir das fibrilhas.	35
Figura 16- Esquema da organização do colagénio fibrilar tipo I.	36
Figura 17- Processo de desnaturação do colagénio, ou seja, destruição da estrutura secundária do colagénio.	37
Figura 18- Esquema da preparação dos filmes de colagénio usada neste trabalho.....	42
Figura 19- Sistema de funcionamento do método da descarga de Corona.	43
Figura 20- Condições de polarização das amostras pelo método do Corona.	43
Figura 21- Matriz de gel de poliacrilamida utilizado para a realização do SDS-PAGE.....	44
Figura 22- Modo de funcionamento SDS-PAGE.	45
Figura 23- Modo de funcionamento da microscopia eletrónica de varrimento.	46

Figura 24- Amostras preparadas para o SEM, com a deposição de ouro.	47
Figura 25- Modo de funcionamento da microscopia de força atómica.....	48
Figura 26- Ângulos de contacto formados em superfícies de materiais a) hidrofílicos e b) hidrofóbicos.	50
Figura 27 - SDS-PAGE do colagénio da cauda de rato tipo I.....	58
Figura 28- Curva de DSC do colagénio em estudo.....	59
Figura 29- Micrografias de microscopia eletrónica de varrimento dos filmes de colagénio.	61
Figura 30- Micrografias óticas: a) lamela de vidro que é utilizada como substrato sobre o qual é depositado o filme de colagénio e b) superfície do filme de colagénio	62
Figura 31- Imagem de AFM de uma das áreas de varrimento realizados a um dos filmes de colagénio da a) topografia, b) distribuição e valor médio de rugosidade medido numa área de 100x100 μm^2 e c) imagem 3D da superfície da amostra.	63
Figura 32- Espectros de infravermelhos dos diversos grupos de filmes analisados	69
Figura 33- Modos de vibração das bandas de amida I e da amida II.	70
Figura 34- Imagens das células hOB aderidas a diferentes superfícies obtidas por microscopia de contraste de fase.....	73
Figura 35- Imagens das células MG-63 aderidas a diferentes superfícies obtidas por microscopia de contraste de fase.....	74
Figura 36- Imagens das células hOB aderidas nas diferentes superfícies, após 4 dias ...	75
Figura 37- Imagens das células MG-63 aderidas nas diferentes superfícies, após 4 dias	77
Figura 38- Teste de multicomparações de Tukey (ANOVA) entre as diferentes superfícies analisadas nas quais as células hOB aderiram.....	78
Figura 39- Teste de multicomparações de Tukey (ANOVA)entre as diferentes superfícies analisadas nas quais as células MG-63 aderiram	79
Figura 40- Micrografias fluorescentes dos núcleos das células hOB que aderiram aos filmes de colagénio.	80
Figura 41- Micrografias fluorescentes das células MG-63 que aderiram aos filmes de colagénio.	81

Índice de Tabelas

Tabela 1- Exemplos de classes de materiais piezoelétricos e eletricamente modificados (HA) existentes.	21
Tabela 2- Alguns exemplos de polímeros estudados na área da engenharia de tecidos.	29
Tabela 3- Diferentes tipos e composições de colagénio e locais onde são maioritariamente encontrados.....	32
Tabela 4- Ângulos de contacto obtidos para os diversos grupos analisados.....	66
Tabela 5- Vibrações e as frequências correspondentes, bem como a ligação e o modo de vibração maioritariamente encontrados no colagénio.	70

Abreviaturas

AFM – *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

ATR-FTIR – *Attenuated total reflectance of Fourier total Infrared Spectroscopy*
(Espectroscopia de Refletância total atenuada do Infravermelho com Transformada de Fourier)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Differential scanning calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varrimento)

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

HA – Hidroxiapatite

MEM – *Minimum Essential Medium (Meio mnimo Essencial)*

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina de fosfato tamponada)

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico)

SEM – Scanning Electron Microscopy (Microscopia Eletrônica de Varrimento)

Capítulo 1

Introdução e Objetivos

1. Introdução e objetivos

1.1. Introdução

A estratégia da engenharia de tecidos, para promover a regeneração, passa por vezes pelo uso de matrizes extracelulares, em formato tridimensional sintéticas, tais como os *scaffolds*. As matrizes sintéticas funcionam como uma plataforma temporária, que conferem suporte mecânico, forma e organização para a formação de tecido novo, através do crescimento e proliferação celular, de forma a permitir a reparação dos tecidos [1, 2]. Com os avanços realizados, ao longo dos últimos anos, na engenharia de tecidos, tem-se tornado evidente que em alguns casos de tratamento, os *scaffolds* devem ser mais do que meros suportes temporários para o crescimento de tecidos novos. [3]. Um biomaterial no contexto da medicina regenerativa deve, então, funcionar como um participante ativo, com o objetivo de facilitar ou mimetizar o processo biológico envolvido no processo regenerativo [4]. O aumento do conhecimento adquirido ao longo dos anos acerca dos processos celulares e as descobertas científicas e tecnológicas sobre células progenitoras de determinados órgãos, realça assim a importância da matriz extracelular sintética, devendo esta ser considerada no processo de desenvolvimento de biomateriais “inteligentes”. Este tipo de materiais geralmente apresenta a capacidade de modificar uma ou mais das suas propriedades em resposta a um estímulo externo [3]. Desta forma, no âmbito da estratégia da medicina regenerativa o desenvolvimento dos designados biomateriais “inteligentes” devem ser baseados estrutural e funcionalmente no meio biológico, de forma a poder intervir ativamente no processo de regeneração [4].

Embora se tenham registado ao longo dos anos avanços importantes na área da medicina regenerativa, existem ainda algumas terapias atuais que apresentam limitações, como por exemplo o uso de enxertos [5, 6] e que justificam igualmente o recurso a materiais “inteligentes” modificados [6].

Os materiais piezoelétricos inserem-se exatamente neste grupo de materiais “inteligentes” que têm então captado, nos últimos anos, a atenção dos investigadores, para a medicina regenerativa. O facto de ter surgido a hipótese de o fenómeno piezoelétrico estar associado à reparação óssea, foi uma das principais motivações para a procura de materiais com características piezoelétricas, como potenciais indutores da regeneração de tecidos. Esta ideia, com as posteriores investigações e descobertas realizadas acerca da origem deste efeito piezoelétrico em determinados tecidos, tais como a pele, tendões, entre outros, alargou rapidamente a ideia do uso de

materiais com superfícies eletricamente carregadas a outros tecidos, como por exemplo no caso do tecido nervoso e da pele [7-10].

Deste modo, têm sido estudados, ao longo dos últimos anos, diversos materiais com características piezoelétricas, nomeadamente cerâmicos como o titanato de bário (BaTiO_3), polímeros sintéticos e naturais, como o ácido poli-L-láctico (PLLA), o poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF) e, o colagénio, entre outros, com a finalidade de serem aplicados na regeneração de tecidos [7, 11-16]. Existem alguns estudos realizados com sucesso nesta área, que aumentam assim, a expectativa do uso de materiais com propriedades piezoelétricas para a medicina regenerativa [7, 14, 17].

O colagénio tipo I foi o material piezoelétrico escolhido para a realização deste trabalho, uma vez que, para além de ser a principal proteína constituinte do organismo humano, representando cerca de 20-30% do total das proteínas existentes no organismo [18, 19], se pensa que as suas características piezoelétricas estejam envolvidas na autorreparação óssea.

1.2. Objetivos

Tem sido provado ao longo dos últimos anos, que quando o colagénio se encontra inserido no meio biológico apresenta propriedades piezoelétricas. Surgiu uma hipótese de que a piezoelectricidade e os potenciais elétricos estão envolvidos na reparação do tecido ósseo, contudo, não se sabe ainda quais os mecanismos que se encontram envolvidos neste fenómeno. Deste modo, surge esta dissertação de Mestrado com o objetivo de preparar e caracterizar devidamente filmes de colagénio, para a sua posterior polarização e análise de qual a influência que as cargas têm na morfologia e adesão de células do tecido ósseo.

Para atingir este principal objetivo foram estipulados os objetivos abaixo indicados.

- **Síntese de filmes finos de colagénio**

Um dos objetivos deste trabalho consistiu na preparação de filmes finos de colagénio, que foram sintetizados a partir do método de *drop-casting*, sendo as gotas da solução de colagénio depositadas numa lamela de vidro.

Os filmes foram preparados a uma temperatura de 37 °C, para a sua posterior caracterização e polarização, de modo a analisar a influência da mesma na morfologia e adesão celular.

- **Polarização dos filmes finos de colagénio**

A partir dos estudos encontrados na literatura, referentes ao uso de materiais piezoelétricos na medicina regenerativa, verifica-se que antes dos mesmos serem utilizados para ensaios *in vivo* ou *in vitro* são sujeitos a estiramentos mecânicos, ou submetidos a uma polarização, cujo objetivo se centra na orientação dos dipolos, de forma a realçar as propriedades piezoelétricas do material em questão [20].

Neste trabalho os filmes foram submetidos a uma polarização, utilizando-se para esse fim o método da descarga de Corona, sendo posteriormente analisados filmes de colagénio como processados, filmes não polarizados, e filmes de colagénio (+) e (-).

- **Caracterização dos filmes finos de colagénio**

A caracterização dos filmes de colagénio passou pelo uso das seguintes técnicas:

- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE);
- Calorimetria Diferencial de varrimento (DSC);
- Microscopia eletrónica de varrimento (SEM);
- Microscopia de Força Atómica (AFM);
- Testes de molhabilidade (medidas de ângulos de contacto);
- Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR);

- **Análise do efeito da polarização na atividade celular**

Dos principais objetivos deste trabalho fez parte a análise da influência que a polarização, ou seja, que a indução de carga nos filmes finos de colagénio, teve na morfologia e adesão celulares. Para tal, os mesmos foram submetidos às condições de polarização descritas no capítulo 3, sendo posteriormente utilizados quatro grupos para a cultura celular:

- dois grupos de controlo: filmes de colagénio como processados, que são utilizados sem qualquer tratamento após a sua obtenção pelo método do *drop-casting*; e filmes não polarizados (NP), que são submetidos às mesmas condições de

temperatura dos filmes polarizados (40 °C), com exceção da aplicação do campo (ver esquema página 43);

- dois grupos de filmes polarizados: um grupo de filmes positivos (+) e por fim um grupo de filmes negativos (-).

A partir dos grupos referenciados serão então analisadas e registadas as variações relativamente aos parâmetros em estudo, entre os diversos grupos.

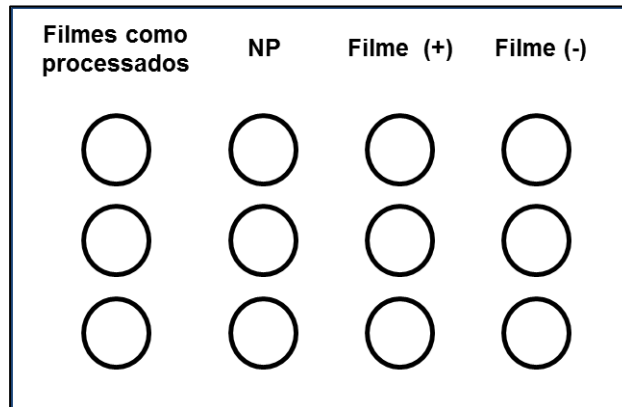


Figura 1: Esquema de organização dos grupos para o ensaio celular.

1.3. Estrutura da tese

Esta tese encontra-se organizada em seis capítulos. O capítulo 1 apresenta uma pequena introdução ao presente trabalho, os principais objetivos e a estrutura da sua organização. O capítulo 2 contém a revisão da literatura relacionada com o tópico em estudo permitindo a sua contextualização. O procedimento experimental é descrito no capítulo 3 com referência aos métodos de síntese e caracterização utilizados e a é apresentada a manutenção das células para ensaios celulares realizados. No capítulo 4 são apresentados os resultados da caracterização do material, a sua análise e discussão, bem como os resultados e discussões referentes aos ensaios celulares. Por fim, apresentam-se as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros, no capítulo 5.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica

O capítulo que se segue descreve as principais descobertas, realizadas ao longo dos últimos anos, relacionadas com a bioeletricidade presente nos tecidos vivos, e contextualiza e justifica os objetivos principais deste trabalho.

2.1. Eletricidade associada ao meio biológico

A presença de fenómenos elétricos no meio biológico já foi detetada há alguns séculos, através de estudos realizados por Galvani no século XVIII [21]. Este realizou uma série de experiências que denotaram que as contrações musculares poderiam ser estimuladas pelo uso de um arco monometálico ou até mesmo pela colocação da extremidade seccionada do nervo em contacto direto com a superfície muscular [22].

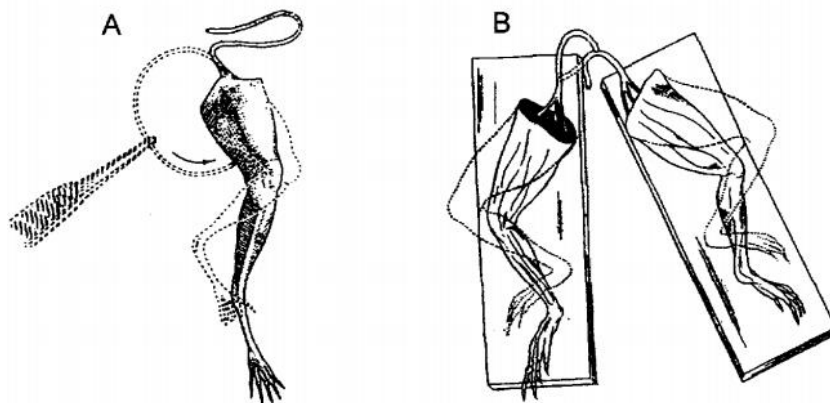


Figura 2- Experiências realizadas por Galvani: (A) contração muscular conseguida através do contacto direto entre o nervo e o músculo; (B) contacto direto entre o nervo de uma perna, com a zona intacta do nervo da outra perna, ocorrendo a contração muscular [adaptado de [22]].

Em 1961 Becker [23] iniciou e efetuou estudos acerca da regeneração de membros, com o especial interesse de perceber qual o mecanismo de controlo que se encontrava por trás do processo complexo da regeneração. Sugeriu-se que, a existência de potenciais elétricos superficiais, que podem ser medidos na superfície dos tecidos biológicos, estão envolvidos no desenvolvimento de embriões, e que provavelmente determinam a organização, diferenciação e especialização no desenvolvimento do organismo [24-26].

O conhecimento da existência de potenciais elétricos no organismo, e as descobertas realizadas por Galvani, levaram a que Becker supusesse que o sinal elétrico estivesse envolvido no controlo do processo de regeneração [27].

Assim, Becker amputou os membros superiores de salamandras, que têm a capacidade regenerativa e mediu os potenciais elétricos da zona distal dos membros amputados, comparando este valor com o potencial da zona ileso proximal, das salamandras. O autor verificou que a resposta característica obtida na zona lesada era a passagem do potencial negativo para positivo, imediatamente após a indução da lesão (amputação), enquanto que, o tecido normal mantinha o seu valor característico negativo. Becker chegou à conclusão que durante o processo de regeneração, o potencial elétrico, medido relativamente ao tecido normal adjacente, se mantinha negativo [23].

Desde os estudos iniciados por Galvani, diversos autores provaram e confirmaram assim as suas teorias, de que existe de facto fenómenos eléctricos associados, ao meio biológico. De facto, mais tarde observou-se que diversos tecidos existentes no organismo humano, tais como os tendões, a pele, os ossos, entre outros, possuem a propriedade particular da piezoelectricidade (i.e. acumulação de cargas eléctricas em resposta à aplicação de uma tensão mecânica e vice versa).

Sabe-se também que a de electricidade no meio biológico está envolvida em grande parte de processos fundamentais, como na contração muscular, nos impulsos nervosos, na reparação óssea, entre outros [9, 22, 28]. Tal como Galvani supunha, a bioelectricidade existe num estado de “desequilíbrio” e pode surgir como resposta a um estímulo interno, que pode ter sido provocado por estímulos externos, como por exemplo a compressão mecânica, no caso do osso [21, 22].

Em 1812, as correntes eléctricas já eram utilizadas para o tratamento de desuniões, que ocorrem frequentemente em casos de fraturas ósseas, que não conseguem proceder à reparação no tempo normalmente previsto [21].

2.2. Constituição do osso

O tema da bioelectricidade associada ao meio biológico, apenas começou a ganhar ênfase na comunidade científica, com a descoberta, realizada por Yasuda [29], nos anos 40, da bioelectricidade no osso.

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, que desempenha diversas funções no nosso organismo [30].

As funções do osso podem ser subdivididas em cinco principais categorias:

- 1) *Suporte*, uma vez que se trata de um tecido rígido e forte adaptado para o suporte de cargas e pesos;
- 2) *Proteção*, dado que, envolve os órgãos vitais, como o cérebro, pulmões, etc., protegendo-os através da absorção de choques e impactos;
- 3) *Movimentação*, pelo facto de permitir a inserção muscular através dos tendões, e quando ocorre a contração musculares permite então o movimento dos ossos e assim do corpo;
- 4) *Armazenamento*, uma vez que alguns minerais existentes no sangue, tais como o fósforo e o cálcio, são captados pelos ossos e aí armazenados;
- 5) *Produção de células sanguíneas*, visto que a maioria dos ossos têm uma cavidade, que é preenchida pela medula óssea vermelha, que é responsável pela produção de plaquetas e células vermelhas [31].

O tecido ósseo é constituído por células designadas por osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que são responsáveis pela respetiva produção, manutenção e reabsorção da matriz óssea [31].

Na zona central dos ossos longos, encontra-se geralmente uma cavidade, designada por cavidade medular, onde se encontra a medula óssea, que é responsável pela produção de novas células sanguíneas [31].

A matriz óssea é constituída a partir de material orgânico- colagénio, maioritariamente tipo I, e proteoglicanos, que representam cerca de 35% da matriz; e por um material inorgânico que se apresenta sob a forma de um cristal de fosfato de cálcio denominado hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e que representa cerca de 75% da matriz óssea [31]. As fibras de colagénio encontram-se altamente orientadas, estando os cristais de hidroxiapatite embebidos ao longo das fibras. Esta combinação entre a hidroxiapatite e as fibras de colagénio confere a devida dureza e resistência ao tecido ósseo [9, 27, 30].

A funcionalidade do osso é garantida pela presença do colagénio e dos minerais. O colagénio confere resistência e simultaneamente flexibilidade à matriz, enquanto os minerais, ou seja a hidroxiapatite constituinte do osso, permitem um aumento da resistência à compressão da matriz óssea [31].

Desta forma, quando é removida a componente mineral do osso, este torna-se bastante flexível, uma vez que o seu principal constituinte passa a ser o colagénio. Se por

outro lado for removido o colagénio da matriz óssea, então o osso torna-se extremamente frágil e quebradiço [31].

No caso dos ossos longos, estes apresentam na sua constituição dois tipos de tecido ósseo: o compacto e o esponjoso. O compacto encontra-se mais na zona da diáfise, que representa a porção cilíndrica do osso, pelo que poderá ser encontrado nessa zona mais à periferia, junto ao perióstio - camada de tecido conjuntivo que reveste o osso e é constituído por colagénio, vasos sanguíneos e nervos, enquanto que o esponjoso se situa mais na zona epifisária, ou seja nas extremidades, dos ossos longos, delimitando também o canal medular dos mesmos [30, 31].

O osso compacto, sendo mais denso e apresentando menos espaçamentos do que o esponjoso, é constituído por unidades designadas de sistemas de Havers. Estes apresentam-se sobre a forma cilíndrica e são compostos por diversas lamelas (fibras de colagénio) que se dispõem concêntricamente em torno de um canal central, onde se encontram vasos sanguíneos e nervos, designado de canal de Havers [30, 31].

Os diâmetros dos canais variam consideravelmente, uma vez que o osso está em remodelação constante. A deposição de novas camadas, ou seja de lamelas constituídas por fibras de colagénio, dá-se da periferia o centro, onde se encontra o canal de Havers. Deste modo, os sistemas mais jovens têm canais mais largos e as lamelas mais internas são as mais recentes [30].

A comunicação entre os osteócitos, que permite a troca de nutrientes, é realizada a partir dos canais de Havers e a partir de canais que se dispõem perpendicularmente ao eixo do osso, designados canais de Volkmann [30, 31].

Os canais vasculares existentes no tecido ósseo são formados a partir da deposição das lamelas de colagénio (formação da matriz óssea) à volta dos vasos sanguíneos pré-existentes [30].

Relativamente ao osso esponjoso, este apresenta inúmeros espaçamentos abertos, onde se situam os vasos sanguíneos e a medula óssea. Este e é constituído por trabéculas que são placas ósseas que se encontram interligadas [31].

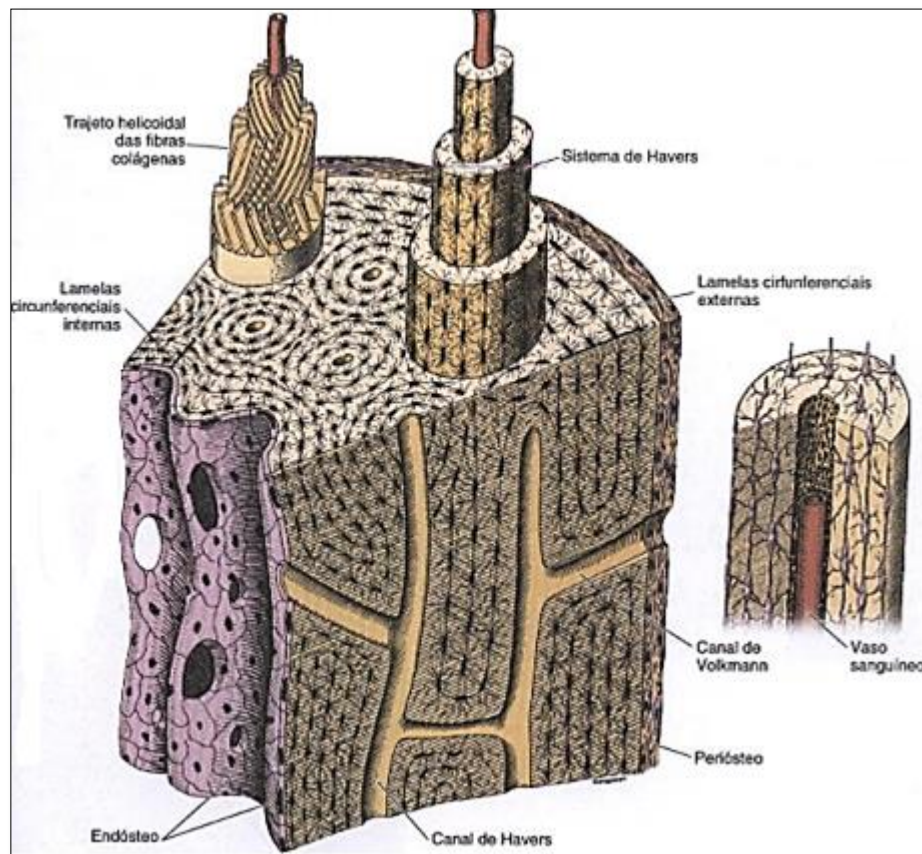


Figura 3- Estrutura do osso compacto [adaptado de [30]]

2.2.1. Remodelação e reparação óssea

O osso é um tecido com um elevado potencial de regeneração, tendo a capacidade de proceder à sua remodelação e autorreparação [32].

A remodelação óssea é conseguida a partir de remoção da matriz óssea antiga, pelos osteoclastos e pela deposição renovada de uma matriz mais jovem, que é realizada pelos osteoblastos. Este fenómeno trata-se de um processo importante, uma vez que esta não garante apenas a modificação da configuração óssea, como também permite uma readaptação do tecido ósseo às linhas de tensões a que o osso está sujeito diariamente [31, 33]. As deformações mecânicas a que a matriz óssea é sujeita, transmitem-se diretamente para as células ósseas, o que permite modificações ao nível do crescimento, diferenciação e morfogénese e expressão genética [32].

Geralmente o tecido ósseo necessita de estímulos externos, como por exemplo as tensões mecânicas, para garantir este processo de remodelação. Tal origina a orientação das trabéculas dos ossos longos segundo as linhas de maiores tensões [31, 33].

O comportamento piezoelétrico do colagénio (descrito mais abaixo em detalhe) juntamente com a constante submissão do osso a deformações mecânicas, sugere que a regeneração e reparação óssea ocorra através da interação dos estímulos mecânicos e elétricos [21, 34, 35].

O processo de autorreparação associado ao osso após uma lesão, como por exemplo uma fratura pode ser dividido em quatro fases principais [31]:

- 1) Formação do hematoma, que ocorre logo após a ocorrência da lesão, dando origem a uma massa de sangue que extravasa dos vasos sanguíneos afetados pela lesão;
- 2) Formação do calo ósseo, que se trata de um tecido que une as extremidades do osso fraturado. Este processo é fundamental, uma vez que o calo ósseo permite a estabilização do osso conferindo uma determinada consistência à zona fraturada;
- 3) Ossificação do calo, em que o osso esponjoso substitui o calo ósseo formado;
- 4) Remodelação óssea, que procede à substituição do osso esponjoso por osso compacto e é então removido o restante calo ósseo e restituído o canal medular.

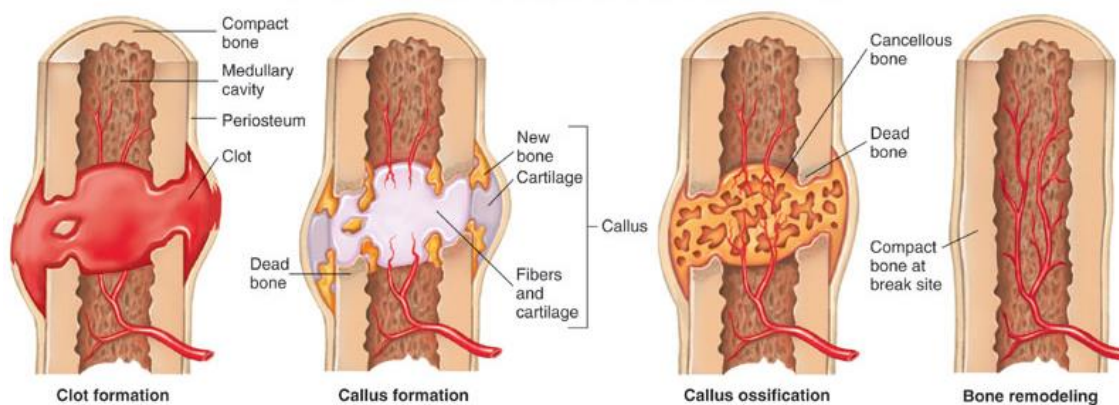


Figura 4- Processos intervenientes na reparação óssea após a ocorrência de uma fratura [adaptado de [31]].

A reparação óssea constitui um processo fundamental para garantir a recuperação de uma lesão sofrida, como por exemplo no caso de uma fratura, permitindo ao paciente a recuperação da sua funcionalidade inicial.

2.2.2. Piezoelectricidade no osso

A existência de eletricidade associada ao tecido biológico foi mais uma vez confirmada quando Yasuda, por volta dos anos 40 descobriu a bioeletricidade no osso. Ao longo dos seus diversificados estudos foram aplicadas tensões mecânicas em ossos longos, verificando-se a formação do calo ósseo mesmo na ausência de fratura. Além disso, observou-se que, em resposta às deformações mecânicas, se gerava um sinal elétrico no osso, pelo que as regiões que se encontravam sobre compressão, apresentaram cargas negativas, enquanto que, as regiões submetidas à tração apresentaram cargas positivas. As observações realizadas levaram a que Yasuda *et al.*, supusessem que o sinal elétrico estivesse envolvido na formação do calo ósseo. Deste modo demonstrou, em estudos posteriores, recorrendo a ossos de coelhos, que o uso de uma corrente direta de 1-100 μA levava à formação do calo ósseo no canal medular [26, 36].

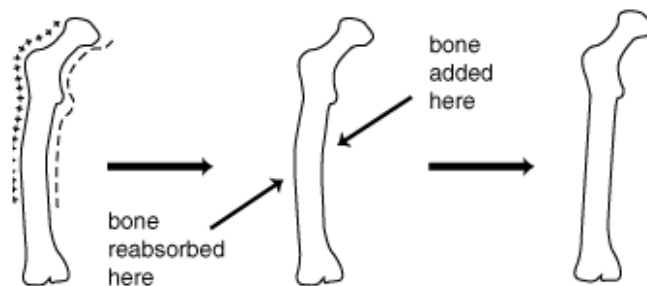


Figura 5- Remodelação óssea [adaptado de [37]]

Contudo, Yasuda *et al.*, não foi o primeiro a conseguir a formação do calo ósseo a partir do uso de uma corrente direta. Por volta do século XIX Garrett utilizou elétrodos percutâneos no tratamento de defeitos ósseos, conseguindo a formação do calo ósseo. Este estudo durou cerca de dois anos, em que a estimulação elétrica era efetuada durante 15 minutos por dia [26, 38].

Apesar dos estudos realizados com sucesso antes do tempo de Yasuda *et al.*, Marino [26] defende que as descobertas realizadas até então foram meramente empíricas, e provêm de um tempo em que a eletricidade era um tema novo. Deste modo,

ele defende que a descoberta realizada por Yasuda *et al.*, foi a que realmente trouxe mais ênfase ao tema da bioeletricidade, uma vez que este trabalho emergiu a partir dos conhecimentos acerca dos estudos da fisiologia óssea e a partir das observações diretas que ele efetuou, durante a realização das suas experiências.

Estudos posteriores à descoberta de Yasuda, realizados por Fukada [9], demonstraram que o osso é piezoelétrico no sentido clássico apresentando, deste modo, o efeito piezoelétrico direto e inverso. O efeito piezoelétrico direto ocorre quando o osso é submetido a estímulos mecânicos, originando daí uma carga no osso, enquanto que, o efeito piezoelétrico inverso, como sugere o nome, ocorre quando é aplicado um campo elétrico no osso, que levará a uma deformação mecânica.

Os autores verificaram que o comportamento piezoelétrico do osso, apenas surgia quando a tensão aplicada na direção do eixo longo do mesmo, gera uma tensão de corte nas fibras de colagénio de forma a que as mesmas deslizem umas sobre as outras [9, 26].

A constante piezoelétrica mais notável e que representará a piezoelectricidade no caso do osso é o d_{14} . [9, 13, 21]. Esta constante representa a carga gerada por unidade de força segundo a direção de polarização, tendo sido medida por Yasuda e Fukada, em ossos secos, obtendo assim um valor de 0,2 pC/N [9, 13]. A constante piezoelétrica pode ser afetada por vários fatores, nomeadamente pelo teor de água e as amplitudes das tensões aplicadas [9, 28, 39]. Além disso, também se verificou que as fibras de colagénio se orientam de acordo com o estímulo elétrico a que o osso é submetido [9, 10, 27].

Para confirmar e completar então as sugestões propostas por Fukada e Yasuda, Marino *et al.*, realizaram um estudo em ossos humanos, para esclarecer se a origem da piezoelectricidade do osso se devia realmente à matriz orgânica constituinte do mesmo. Para tal, procederam à subdivisão em dois grupos dos ossos em estudo: num dos grupos os ossos foram desmineralizado e no outro foi então retirado o colagénio [27]. Deste modo, procederam ao cálculo da constante piezoelétrica (d_{14}) para ambos os grupos verificando que, enquanto o grupo de ossos que apresentavam na sua constituição o colagénio mostravam valores acima dos $2,5 \times 10^{-9}$ c.g.s.e.s.u. (0,08 pC/N), os que continham apenas a componente inorgânica não apresentaram qualquer comportamento piezoelétrico [27]. Estes estudos provaram assim que a piezoelectricidade do osso está associada ao colagénio. Estes estudos levaram também na altura à conclusão de que os cristais de hidroxiapatite não são os responsáveis pelo comportamento piezoelétrico do osso. Admitiu-se à época, que este comportamento está relacionado com o facto de os cristais individuais da componente mineral (hidroxiapatite) existentes no osso

pertencerem a uma classe centrossimétrica, ou seja, que apresentam centro de simetria, e por isso serem incapazes de exibir piezoelectricidade [27]. No entanto, estudos mais recentes, utilizando técnicas de análise de comportamento eléctrico local (nomeadamente microscopia de força atómica, por recurso a ponta de prova piezoeléctrica) levantaram novamente a questão da existência ou não de comportamento piezoeléctrico em cristais de hidroxiapatite [40, 41]. No entanto, estes resultados são controversos e ainda não foram reproduzidos.

2.3. Estimulação eléctrica para a reparação de tecidos biológicos

Ficou claro, com as descobertas realizadas ao longo dos anos, que as estimulações mecânicas e eléctricas induzem a formação do calo ósseo, levando conseqüentemente à remodelação e autorreparação do osso [42].

Deste modo, tem vindo a ser explorado com sucesso, o uso de correntes eléctricas como forma de tratamento, no caso de tecidos lesados. Os estudos realizados nesta vertente demonstraram que as cargas eléctricas influenciam o comportamento celular, tendo um papel importante na estimulação da diferenciação e proliferação celular em diversos tecidos, promovendo assim o processo da reparação [11, 43].

No caso do tecido ósseo foram realizados diversos estudos, durante os últimos anos, em que ossos animais e humanos foram submetidos a correntes eléctricas externas para a formação de novo tecido ósseo. Segundo Marino [26], para que ocorra a osteogénese é necessário aplicar uma corrente acima dos 5 μA , atingindo esta o seu pico máximo com a aplicação de uma corrente entre os 5-20 μA . Se por outro lado, a corrente aplicada ultrapassar os 20 μA , inicia-se o processo de destruição óssea.

Este tipo de tratamento em que são utilizadas correntes eléctricas como forma de estimulação para a formação de tecido novo, não é apenas aplicado especificamente ao tecido ósseo. Recentemente foi realizado um estudo para perceber qual o efeito da aplicação de corrente eléctrica na remodelação do tecido periodontal de ratos. Para tal, utilizaram então correntes alternadas de 0, 50 e 100 μA durante duas semanas e verificou-se que os grupos, em que foram aplicadas as correntes de 50 e 100 μA , apresentavam um aumento da produção do factor de crescimento de fibroblastos, que está envolvido na remodelação do tecido periodontal. Além disso, apresentavam uma densidade de colagénio superior do que no caso dos ratos em que não se utilizou corrente eléctrica [44].

Apesar dos estudos realizados com sucesso, existe a necessidade de definir e uniformizar os parâmetros utilizados na estimulação elétrica [45, 46].

2.3.1. Efeito piezoelétrico

Alguns materiais têm a capacidade de criar um momento dipolar elétrico (P), quando submetido a uma determinada pressão [21]. Este efeito, designado de piezoelectricidade foi descoberto pelos irmãos Curie por volta de 1880, quando estes aplicaram tensões nos cristais do sal Rochelle (tartarato de sódio e potássio) e de quartzo, resultando daí uma carga elétrica no material. Este efeito tem vindo a ser utilizado numa elevada gama de aplicações, nomeadamente na área médica [13, 18, 20, 47]. A piezoelectricidade é um processo reversível que se define pela polarização/ carga elétrica que é gerada num material, quando determinados cristais são submetidos a uma compressão ou tensão mecânica. A este fenómeno dá-se o nome de efeito piezoelétrico direto [20, 47, 48]. Contudo, os materiais que apresentam propriedades piezoelétricas dispõem também de um efeito piezoelétrico inverso, que ocorre quando a aplicação de uma carga elétrica, no material, leva à sua deformação mecânica [18, 20, 47-49]

O fenómeno da piezoelectricidade está inerente à microestrutura do material, pelo que esta propriedade apenas se exhibe em materiais que não apresentam qualquer centro de simetria por parte das células unitárias que os constituem [18]. Existem 7 sistemas cristalográficos: cúbico, tetragonal, romboédrico, monoclinico, triclinico, ortorrômbico e hexagonal [18]. E existem 32 classes cristalinas, das quais 21 são não-centrosimétricas, ou seja não possuem um centro de simetria, e destas 20 apresentam a piezoelectricidade.

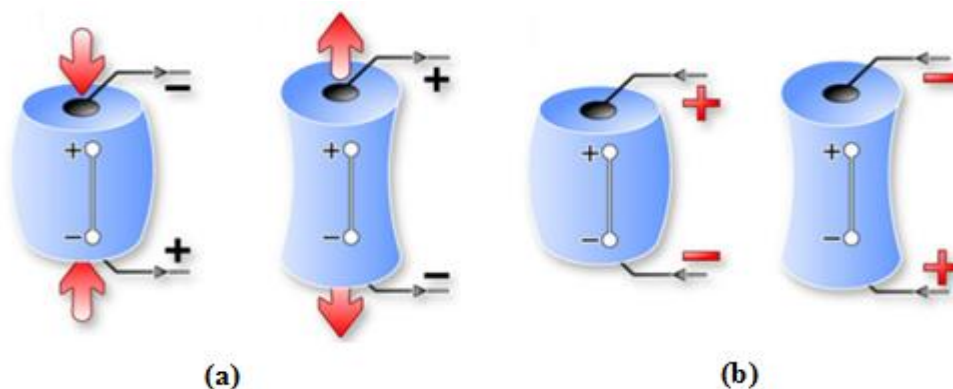


Figura 6- Efeito piezoelétrico direto (a), através da aplicação de cargas de compressão e tração e efeito piezoelétrico inverso (b), através da aplicação de um campo elétrico ao material. [adaptado de [13]]

Deste modo, os cristais que possuem um centro simétrico não apresentam um comportamento piezoelétrico, uma vez que os dipolos (p) que se geram se anulam mutuamente. Se por outro lado o material cristalino não apresentar qualquer centro de simetria, uma força externa que é aplicada no mesmo pode levar à deslocação, em direções únicas, dos átomos ou iões, levando a que o centro geométrico das cargas positivas e negativas deixe de ser simétrico. Desta forma, o deslizamento das cargas positivas e negativas, umas relativamente às outras, leva à geração de um dipolo elétrico e assim a uma polarização no material [13, 18, 47, 50].

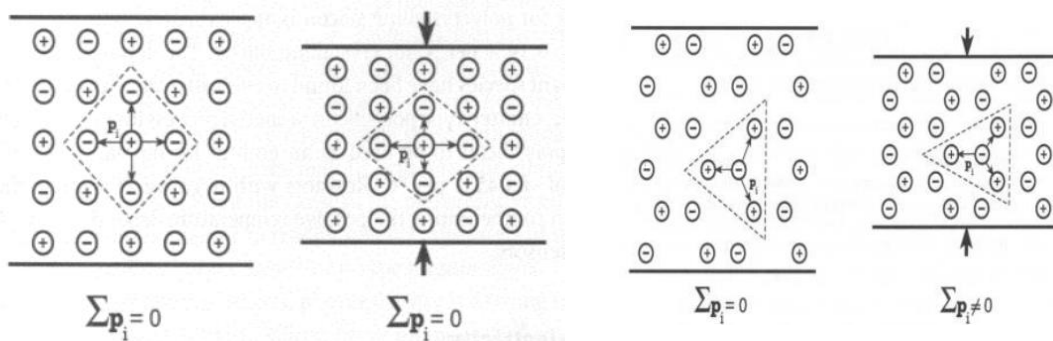


Figura 7- Materiais que possuem um centro de simetria, que com a aplicação de uma tensão acabam por ser anulados os dipolos que se geram (materiais não piezoelétricos) e materiais que não possuem centro de simetria e que com a aplicação de uma tensão se gera uma polarização (materiais piezoelétricos) [adaptado de [51]]

O efeito piezoelétrico é caracterizado pelo coeficiente piezoelétrico d que define: a polarização gerada por unidade de deformação mecânica ou a deformação mecânica resultante da aplicação de um campo elétrico. Tendo em conta a figura 8 por exemplo a constante d_{14} representa a polarização induzida na direção 1 em resposta a uma tensão de cisalhamento em torno do eixo 1. Já a constante d_{33} representa a polarização induzida na direção 3 por unidade de tensão aplicada na direção 3 [52].

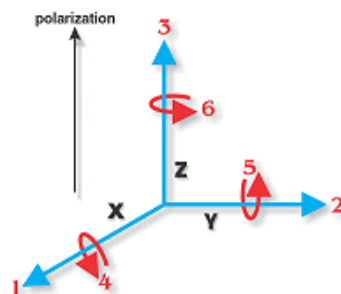


Figura 8- Direção das forças que afetam a polarização [adaptado de [52]]

Diversos estudos realizados demonstram que os materiais que apresentam características piezoelétricas poderão eventualmente ser utilizados para se obterem superfícies bioativas polarizadas, para a regeneração de tecidos [11, 17]. Deste modo, serão apresentados de seguida alguns materiais piezoelétricos, que foram estudados na área da regeneração de tecidos, de forma a perceber quais as influências das suas propriedades piezoelétricas na atividade celular.

2.3.2. Aplicações de materiais com propriedades piezoelétricos ou modificados eletricamente na engenharia de tecidos

A descoberta da bioeletricidade no tecido biológico, e o facto de esta poder estar envolvida no processo de reparação dos mesmos, levou à ideia do uso de materiais especializados, como é o caso dos materiais piezoelétricos, como possíveis indutores para a medicina regenerativa. Estes estudos têm estado até ao momento muito centrados no tecido ósseo.

Deste modo, tem surgido ao longo dos últimos anos, o interesse no desenvolvimento de biomateriais com propriedades piezoelétricas ou eletricamente modificados, uma vez que estes têm demonstrado resultados promissores na regeneração óssea.

Para gerar substratos apresentando cargas superficiais pode se recorrer a [13]:

- i) carregar electricamente materiais pela aplicação de um campo elétrico a elevadas temperaturas;
- ii) e usar materiais piezoelétricos que são capazes de gerar uma polarização em resposta a uma tensão mecânica.

É de salientar que os materiais piezoelétricos também podem ser sujeitos a aplicação de um campo elétrico resultando na orientação dos seus dipolos e na maximização das suas propriedades piezoelétricas

Diversas classes de materiais piezoelétricos (cerâmicos, poliméricos ou compósitos) têm vindo a ser exploradas, com a finalidade de serem utilizados na medicina regenerativa [7, 14, 53].

Nesta secção serão apenas abordados alguns materiais piezoelétricos, nomeadamente o material escolhido para o desenvolvimento deste trabalho- o colagénio, apresentando-se também estudos realizados com os mesmos na área da medicina regenerativa.

Tabela 1- Exemplos de classes de materiais piezoelétricos e eletricamente modificados (HA) existentes.

Materiais eletricamente carregados utilizados na medicina regenerativa		
Cerâmicos	- Titanato de bário (BaTiO_3) - Hidroxiapatite (HA) polarizada	
Poliméricos	Não biodegradáveis	- Poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF)
	Biodegradáveis	- Colagénio - Ácido poli-L-láctico (PLLA)
Compósitos	- Compósitos de BaTiO_3 com poli (trifluoro etileno de vinilideno) - Compósitos de titanato de bário e hidroxiapatite (HABT)	

- Cerâmicos piezoelétricos e eletricamente modificados

Apesar dos materiais cerâmicos, que apresentam características piezoelétricas, terem uma aplicação mais vasta nas áreas tecnológicas e elétricas [49], estes têm sido alvo de estudos, ao longo dos últimos anos, para aplicações na área médica, nomeadamente na área da medicina regenerativa. Ao longo dos últimos anos, têm sido estudados materiais cerâmicos que apresentam características piezoelétricas ou que tenham sido modificados eletricamente para a regeneração óssea. A maioria dos biocerâmicos piezoelétricos que têm sido propostos para esta vertente da engenharia de tecidos, contém titanato de bário, que é um dos materiais cerâmicos com constante piezoelétrica mais elevada, podendo esta ir até aos 600 pC/N [13]. Outro material (neste caso cuja piezoelectricidade não foi ainda definitivamente provada) que tem vindo a ser estudado é a hidroxiapatite polarizada, que é modificada eletricamente, pelo que a origem da carga superficial é conseguida através da polarização do material.

Os diversos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* demonstram que, para além destes materiais serem biocompatíveis, demonstram também promover a adesão e atividade celular osteoblástica, bem como o crescimento de tecido ósseo novo [13].

- Titanato de bário (BaTiO_3):

Nos cerâmicos piezoelétricos mais conhecidos enquadra-se o titanato de bário (BaTiO_3), que apresenta propriedades piezoelétricas e ferroelétricas elevadas. Este material pertence a um grupo designado de *perovskites* (Figura 9), estrutura esta que é adotada por grande parte dos óxidos que apresentam a fórmula química de ABO_3 . Esta estrutura pode classificar-se como uma forma cúbica simples, que tem os cátions de dimensões maiores (A), nos vértices do cubo; cátions ligeiramente mais pequenos (B), no centro do cubo e por fim os oxigénios (O) no centro das faces do cubo [49]. Os grupos de materiais que pertencem ao grupo das estruturas perovesquíticas são os que apresentam a constante piezoelétrica mais elevada.

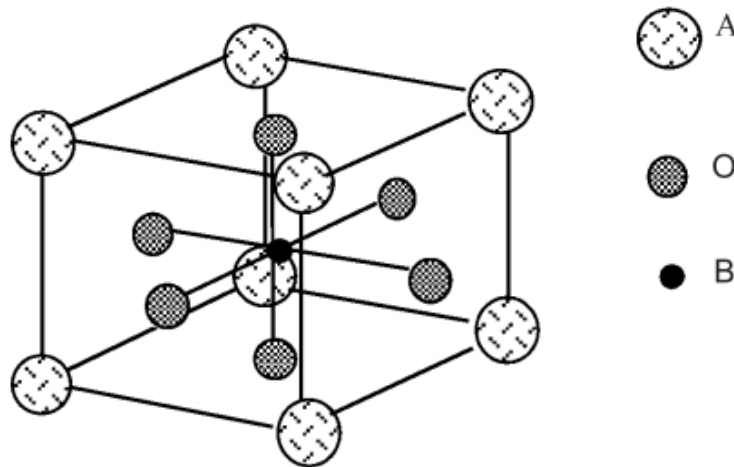


Figura 9- Estrutura da *perovskite* característica dos óxidos que apresentam a fórmula química ABO_3 . [adaptado de [18].

O titanato de bário é piezoelétrico abaixo da temperatura de Curie (T_c), uma vez que ocorre a transformação da célula unitária de forma cúbica que apresenta simetria, para uma estrutura assimétrica, geralmente representadas pela forma tetragonal ou romboédrica. Esta transformação leva a uma alteração da posição dos iões da célula unitária, que resulta na distribuição assimétrica dos mesmos, acabando por gerar uma polarização no material [13, 49].

O BaTiO_3 tem sido alvo de estudos para a aplicação na reparação óssea, nomeadamente em combinação com outros materiais. Furuya *et al.* [54], estudou o efeito piezoelétricos de cargas superficiais do titanato de bário na diferenciação de células ósseas de rato. Para avaliar a diferenciação celular foram monitorizadas a atividade

da fosfatase alcalina (ALP) e o teor de cálcio, tendo-se registado um ligeiro aumento de ambos os parâmetros nas superfícies de BTO carregadas. Os autores concluíram que as cargas superficiais do BTO levaram a uma aceleração na osteogénese.

Além disso, realizaram-se estudos acerca da biocompatibilidade de membranas compósitas de poli (trifluoro etileno de vinilideno) combinado com titanato de bário (P(VDF-TrFE)/BT), em comparação com membranas não piezoelétricas de poli (tertafluoroetileno) (e-PTFE). Neste foi demonstrado que as membranas piezoelétricas de (P(VDF-TrFE)/BT) para além de apresentarem uma biocompatibilidade superior às membranas não piezoelétricas, também foi registada uma maior adesão celular nas membranas piezoelétricas [13, 55]. Além da combinação de BaTiO₃ com poli (trifluoro etileno de vinilideno), também foi analisada a citotoxicidade de compósitos de titanato de bário e hidroxiapatite (HABT). Neste estudo foi demonstrado que os compósitos de HABT são biocompatíveis, não demonstrando qualquer efeito citotóxico por parte deste material compósito piezoelétrico. Além disso, verificou-se através de estudos realizados *in vitro* que os compósitos HABT promovem a adesão celular osteoblástica [56].

- Hidroxiapatite (HA) polarizada:

Actualmente a hidroxiapatite polarizada não se enquadra nos materiais piezoelétricos, sendo classificada como um material eletricamente modificado [13]. No entanto, porque a hidroxiapatite é um dos principais constituintes do osso, tem sido extensivamente estudada como potencial substituto ósseo, uma vez que permite estabelecer interações químicas favoráveis com o osso. Como já referido anteriormente uma das formas de obtenção de cargas superficiais é conseguida através da submissão do material a um campo elétrico, também designado de processo de polarização. No caso da hidroxiapatite este processo é realizado a temperaturas elevadas, uma vez que, se pensa que ocorre ordenação dos iões OH⁻, constituintes da rede de HA, durante o processo de polarização [13].

Estudos efetuados por Bodhak et al. [57], verificaram um aumento da adesão de osteoblastos humanos em superfícies polarizadas negativamente de HA, tendo para além disso verificado uma diminuição celular nas superfícies positivas. O aumento da atividade dos osteoblastos nas superfícies de hidroxiapatite polarizadas não foi apenas verificada por Bodhak *et al.*, Itohet *et al.* [58], registaram igualmente um aumento da atividade de osteoblastos e um decréscimo da atividade dos osteoclastos nas superfícies de placas de hidroxiapatite polarizadas positiva e negativamente que foram implantadas em ossos de

ratos. Estudos posteriores *in vivo* com amostras porosas de HA polarizadas demonstraram um aumento do crescimento ósseo tendo sido detetada a formação de tecido ósseo novo nas regiões centrais do material poroso polarizado, que foi implantado em fêmures de coelhos realizados [59].

Baxter *et al.* [13], referencia diversos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* ao longo dos últimos anos com a hidroxiapatite polarizada, que demonstraram a existência de uma alteração na resposta biológica, comparativamente à hidroxiapatite não polarizada. A HA polarizada, quer positivamente quer negativamente, demonstram ser benéficos relativamente à reparação e crescimento ósseo.

- Polímeros piezoelétricos

Para além dos materiais cerâmicos, os polímeros piezoelétricos também têm sido alvos de investigação como possíveis indutores da reparação de diversos tecidos, tais como o ósseo, a pele, os nervos, etc.

Alguns exemplos de polímeros piezoelétricos que têm sido investigados ao longo dos últimos anos são o polifluoreto de vinilideno (PVDF), o ácido poli-L-láctico (PLLA) e colagénio.

- Poli (fluoreto de vinilideno) (PVDF):

O poli (fluoreto de vinilideno) enquadra-se nos polímeros sintéticos não biodegradáveis que apresentam propriedades piezoelétricas. Esta propriedade do PVDF foi descoberta por Kawai [60] em 1969, que demonstrou que este polímero quando submetido a um campo elétrico (polarização) apresentava uma constante de piezoelectricidade de 6-7 pC/N [18].

O PVDF pode apresentar-se em pelo menos quatro fases cristalinas, dependendo da conformação da cadeia, sendo estas representadas por: α , β , γ e δ . A fase α é a fase mais comum e estável sendo esta apolar dado que os momentos dipolares criados se anulam mutuamente. A característica piezoelétrica do PVDF deve-se à fase β , que é polar. Geralmente a fase β é obtida a partir do estiramento mecânico de filmes de PVDF que se apresentem na fase α , provocando desta forma a orientação das cadeias

moleculares, sendo posteriormente submetidos à polarização com carga elétrica para induzir um momento dipolar [18, 61, 62].

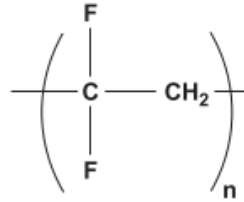


Figura 10- Estrutura do polifluoreto de vinidileno (PVDF). [adaptado de [18]]

Guo *et al.*, realizaram um estudo, com sucesso, em que se utilizaram *scaffolds* com propriedades piezoelétricas, através da introdução de PVDF, conjuntamente com o poliuretano (PU), para a regeneração de feridas. Os *scaffolds* foram implantados subcutaneamente em ratos, para analisar a sua biocompatibilidade e para perceber qual a influência que o efeito piezoelétrico tem na atividade dos fibroblastos. Deste modo, os autores verificaram então, que os *scaffolds* piezoelétricos demonstraram uma maior adesão, migração e secreção por parte dos fibroblastos, quando comparados aos *scaffolds* que apenas continham PU e que não apresentam assim propriedades piezoelétricas. Segundo os autores o aumento da atividade dos fibroblastos observada deve-se à estimulação piezoelétrica, que foi conseguida através da deformação mecânica, originada pela movimentação dos ratos [11].

Além do uso do PVDF na regeneração de feridas, este polímero piezoelétrico também tem sido investigado para a regeneração nervosa [12, 63, 64]. O cultivo de células neuronais em *scaffolds* piezoelétricos de PVDF demonstram um aumento significativo da presença de fibras nervosas e extensões neuronais, quando comparadas aos *scaffolds* sem propriedades piezoelétricas [43, 65].

- Ácido poli-L-láctico (PLLA):

O PLLA é um poliéster alifático linear semi-cristalino, que apresenta diversas características, tais como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade, um conjunto favorável de propriedades mecânicas e características piezoelétricas, que tornam este polímero bastante atrativo para a engenharia de tecidos. O ácido poli-L-láctico é um

polímero sintético utilizado em diversas aplicações médicas, tais como, em parafusos reabsorvíveis, suturas, etc [53].

O efeito piezoelétrico do PLLA é conseguido através do estiramento dos filmes, o que leva a um alinhamento das regiões amorfas acabando por facilitar, através da aplicação de um campo elétrico, a rotação uniforme das cristalites [66].

Neste polímero o grau de cristalinidade influencia a constante piezoelétrica, pelo que, com o aumento do grau de cristalinidade do PLLA, também se regista um aumento da sua constante piezoelétrica, podendo esta atingir um valor de $d_{14} = 9,82$ pC/N. Quando este polímero se encontra na sua fase amorfa, este exhibe pouca ou nenhuma piezoelectricidade [7, 67, 68].

Ao longo dos anos o ácido poli-L-láctico tem vindo a ser estudado como potencial indutor de regeneração a nível da regeneração de tecidos. Neste sentido foi recentemente iniciado na Universidade de Aveiro, e neste grupo de investigação, estudos pioneiros do papel da polarização em filmes e fibras de PLLA nos fenómenos de adesão proteica e proliferação celular. Como a adsorção proteica constitui um dos primeiros processos que ocorrem depois da colocação *in vivo* de um dispositivo com fins regenerativos, realizou-se um estudo para analisar a influência da polarização, ou seja da carga elétrica de filmes de PLLA, na adsorção de proteínas, que demonstrou uma clara preferência de adesão das proteínas nos filmes biodegradáveis polarizados comparativamente aos não polarizados [7, 53]. Um nicho promissor na engenharia do tecido neural é o uso de substratos capazes de fornecer sinais elétricos, que aumentem a regeneração neural. Neste âmbito um estudo muito recente revelou que PLLA (filmes e fibras) eletricamente carregados apresentando uma polarização até $30 \mu\text{C}/\text{m}^2$, apresentam efeitos benéficos na diferenciação das células neuronais potenciando o crescimento neuronal [69].

- Colagénio:

O colagénio é a proteína mais abundante que existe no organismo humano. Este constitui grande parte da matriz extracelular na maioria dos tecidos, e apresenta propriedades piezoelétricas que têm vindo a ser estudadas nos últimos anos [10, 27, 39]. O efeito piezoelétrico nos polímeros naturais deve-se à rotação interna dos grupos polares, que estão ligados aos carbonos assimétricos. Nos polímeros naturais a piezoelectricidade que geralmente é registada apenas se trata da piezoelectricidade de corte [70, 71]. O efeito piezoelétrico é geralmente representado pela constante piezoelétrica, que no caso do colagénio é o d_{14} . O seu valor é de aproximadamente 2,5

pC/N [66], podendo o valor desta constante variar significativamente com a temperatura e o grau de hidratação, ou seja, com o teor de água [72].

A constante piezoelétrica do colagénio foi medida no tendão e em osso de bovino, registando-se um decréscimo, em ambos, do d_{14} com o aumento do teor de água. Os autores deduzem que a polarização é anulada pela ligação transitória da água às regiões polares responsáveis pela piezoelectricidade no colagénio [73].

Como a deposição de hidroxiapatite determina o crescimento e reparação óssea, realizaram-se estudos acerca da influência das propriedades piezoelétricas do colagénio na atividade de mineralização do osso. Nestes estudos, foi demonstrado que nas regiões em que o colagénio se encontrava deformado, o processo de mineralização óssea, se iniciou mais rapidamente comparado às regiões que não se encontravam deformadas. Deste modo, os autores chegaram à conclusão que o efeito piezoelétrico do colagénio pode funcionar como um indutor do processo de mineralização e, promover assim o processo de mineralização do osso, na ausência de células ósseas [15, 74].

Estudaram-se também as propriedades piezoelétricas e dielétricas da combinação do colagénio com hidroxiapatite para a regeneração óssea. A constante piezoelétrica (d_{14}) medida para os filmes de colagénio processados a partir de colagénio de bovino ronda aproximadamente os 0,062 pC/N [75]. A introdução da hidroxiapatite induziu uma redução do d_{14} do colagénio para 0,040 pC/N, aquando a utilização da hidroxiapatite (HA) nanocristalina e para 0,012 pC/N, no caso do uso da hidroxiapatite comercial. Uma explicação dada para este decréscimo do d_{14} é o facto da introdução da hidroxiapatite influenciar a organização do colagénio, diminuindo a organização microestrutural das fibras, devido à elevada força iónica que a hidroxiapatite exerce sobre o colagénio. [70, 75].

Ferreira *et al.* [76], verificaram que o efeito piezoelétrico do colagénio, no osso, promove a adesão celular, nas regiões sobre tensões, quando comparado com regiões que não se encontram deformadas. Tal foi comprovado através de um estudo realizado com colagénio do tipo I, cujo objetivo se centrava na perceção de qual a influência que o efeito piezoelétrico do colagénio tem na orientação das células osteoblásticas. Para tal, compararam colagénio em que foi introduzida uma deformação, para realçar o fenómeno de piezoelectricidade, com colagénio que não foi submetido a qualquer tipo de deformação. Os autores registaram uma maior adesão celular no colagénio que foi submetido a deformações [76].

Analisando os estudos anteriormente referidos é possível verificar que o efeito piezoelétrico de alguns materiais piezoelétricos sejam estes naturais ou sintéticos, têm de facto influência na atividade celular e na adsorção proteica. Na sua maioria, os estudos acima referidos verificaram um aumento da atividade celular que tem um impacto positivo na reparação e assim na regeneração dos tecidos. Observa-se que foram realizados diversos estudos com titanato de bário, PLLA, PVDF, hidroxiapatite polarizada entre outros, com sucesso na medicina regenerativa. Contudo, existe na literatura pouca informação acerca de qual a influência das cargas do colagénio eletricamente carregado na atividade celular. Deste modo surge então este trabalho, com o objetivo de explorar essa vertente, destacando-se inclusive no uso de colagénio carregado positivamente e negativamente.

2.4. Polímeros na engenharia de tecidos

A estratégia da engenharia de tecidos, para promover a regeneração, passa por vezes pelo uso de matrizes extracelulares, em formato tridimensional sintéticas, tais como os *scaffolds*. As matrizes sintéticas funcionam como uma plataforma temporária para o crescimento e proliferação de células, de forma a permitir uma rápida reparação dos tecidos [1, 2]. Para que estas matrizes extracelulares satisfaçam a interação com os tecidos e a proliferação celular, é necessário que satisfaçam determinadas propriedades mecânicas e físicas [77-79]. A satisfação destas condições passa pela escolha do material adequado, que reúna as características favoráveis, para o seu uso na engenharia de tecidos.

Ao longo dos anos, tem vindo a ser utilizado uma gama variada de materiais na engenharia de tecidos [80, 81]. Estes materiais incluem metais, cerâmicos, polímeros e compósitos. Os materiais cerâmicos e metálicos apresentam determinadas desvantagens, tais como a ocorrência da degradação no meio biológico, a limitação da sua processabilidade e no caso dos metais pode ocorrer o efeito de “*stress shielding*”, que se trata da reabsorção óssea no local de implante [2, 82, 83].

Um grupo de materiais que apresenta elevada aplicabilidade na área da engenharia de tecidos, e que satisfaz as condições necessárias são os polímeros. Estes são frequentemente utilizados em aplicações médicas, devido às suas propriedades biocompatíveis, biodegradáveis, mecânicas e elétricas. Os polímeros podem ser classificados em dois grupos: os sintéticos e os naturais. Os polímeros naturais são

obtidos a partir de fontes naturais, como por exemplo a partir de origem animal ou vegetal. Nestes enquadram-se, entre outros, os polissacarídeos, tais como o quitosano, ácido hialurónico, a agarose, o alginato e as proteínas como o colagénio, e a fibrina [1, 2, 5, 18]. Relativamente aos polímeros sintéticos, a sua estrutura determina a sua versatilidade química e processabilidade. Destes fazem parte, por exemplo, os poliésteres, as poliamidas, os polifosfazenos e os polianidridos. Dos materiais sintéticos, os mais utilizados são os poliésteres que incluem: o ácido poli-L-láctico (PLLA), o ácido poliglicólico, a policaprolactona e o policarbonato [1, 2, 5, 18]. Nos polímeros sintéticos não biodegradáveis enquadram-se o polietileno, poli (álcool vinílico), silicones, polipropileno entre outros, que também são utilizados na engenharia de tecidos [18].

Tabela 2- Alguns exemplos de polímeros estudados na área da engenharia de tecidos.

Polímeros			
Naturais	Sintéticos	Algumas das aplicações investigadas	Referência
<ul style="list-style-type: none"> - Colagénio - Quitosano - Fibrina 	<ul style="list-style-type: none"> - Ácido poli-L-láctico (PLLA) - Ácido poliglicólico (PLGA) - Policaprolactona (PCL) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Scaffolds</i> como suporte para o crescimento de tecidos; - Sistemas para a libertação controlada de fármacos; - Dispositivos para a fixação ortopédica (parafusos, etc.); - Suturas. 	[84-87]

Os polímeros naturais têm a potencial vantagem de serem reconhecidos biologicamente, o que pode suportar positivamente a adesão e funcionalidade celular [2]. Além disso, os polímeros naturais apresentam a capacidade de interagir com o meio biológico que se apresenta como um meio altamente dinâmico com um pH por volta de 7,3 e que contém gases dissolvidos, como o O₂, eletrólitos, células e proteínas, que pode levar à degradação de determinados materiais [88].

Dos polímeros acima representados, o colagénio é um dos materiais mais utilizados para aplicações biomédicas. Na secção que se segue será essencialmente abordado o colagénio dado que se trata do material selecionado para a realização deste trabalho.

2.4.1. Colagénio

O colagénio é a proteína mais abundante existente no organismo humano, representando cerca de 20-30% do total das proteínas existentes no organismo [18, 19]. Este trata-se de um material com propriedades piezoelétricas que se enquadra nos polímeros naturais e existe em diversas formas no nosso organismo [18, 75].

Este polímero natural é uma proteína bem conhecida, constituído por cadeias polipeptídicas com sequências variadas de aminoácidos e utilizada numa gama variada de aplicações médicas [19]. Uma das principais razões pelo uso do colagénio neste tipo de aplicações deve-se ao facto de este polímero se apresentar sobre a forma de fibras, que proporcionam uma resistência elevada e conferem estabilidade devido às suas capacidades de agregação e *crosslinking* [19]. O colagénio é então responsável por conferir integridade estrutural e resistência à tração nos tecidos [18].

Diversos polímeros sintéticos e naturais são utilizados atualmente para o processamento de biomateriais, no entanto, as características do colagénio distinguem-se dos polímeros sintéticos, essencialmente devido ao seu modo de interação com o meio biológico [19, 89]. O colagénio desempenha um papel fundamental na formação de determinados tecidos e órgãos, estando também envolvido na expressão de várias funcionalidades das células [19]. Este constitui a matriz extracelular, que representa o elemento básico de todo o tecido conjuntivo e constitui a componente funcional maioritária do osso, cartilagem, pele, entre outros tecidos.

As propriedades mecânicas dos tecidos ricos em colagénio, como tendões, ossos, etc., são largamente determinadas pela estrutura deste polímero natural [90]. O colagénio é organizado por fibras que apresentam uma elevada resistência à rutura, sendo responsáveis pela transmissão de forças, dissipação de energia e pela prevenção à falha mecânica prematura dos tecidos normais [91].

Quando ocorre a lesão dos tecidos, a presença do colagénio é fundamental para garantir a restauração da estrutura e da funcionalidade, bem como para proporcionar a reparação do defeito no tecido. Contudo, é necessário ter em conta que as proporções de colagénio depositadas sejam adequadas, uma vez que a presença de excesso de colagénio resulta na perda da estrutura anatómica normal e da sua funcionalidade. Se por outro lado o colagénio for depositado em proporções reduzidas, leva à fragilidade da zona lesada [18].

2.4.2. Tipos de colagénio

O colagénio é uma molécula, com um peso molecular de aproximadamente 300 000 Da [92, 93], constituída a partir de uma sequência de aminoácidos, que estão interligados entre si por ligações peptídicas. A maioria dos aminoácidos apresentam cadeias secundárias designadas de grupos (R), que podem ser representados por grupos de amina, que apresentam cargas positivas ou por grupos carboxilos, que apresentam a carga negativa [21].

Existem mais de 20 tipos geneticamente diferentes de colagénio, que se distinguem pela sua morfologia, função e composição química [18, 30, 94] . (Tabela 3) O colagénio pode ser classificado em colagénio fibrilar e não fibrilar, dependendo da sua capacidade de formar uma estrutura fibrosa. As estruturas do colagénio são um conjunto de combinações precisas utilizando uma combinação de variadas cadeias polipeptídicas, sendo estas representadas por: $\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$, $\alpha 1(II)$, $\alpha 1(III)$, $\alpha 1(V)$, entre outros, que representam os diversos tipos de cadeias polipeptídicas [18].

Dos diversos tipos de colagénios existentes, os que são mais frequentes no organismo são os que se apresentam na forma fibrosa, sendo estes representados pelos tipos I, II, III, V e XI. Estas moléculas são caracterizadas por serem altamente orientadas com capacidades de agregação, apresentando características estruturais elevadas [18, 94].

Tabela 3- Diferentes tipos e composições de colagénio e locais onde são maioritariamente encontrados [18, 30, 95].

Tipo	Composição da cadeia	Estrutura	Tecido representativo
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	Molécula com 300 nm	Derme, tendão, fibrocartilagem, dentina, pele, osso, vasos sanguíneos.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Molécula com 300 nm	Cartilagem, núcleo pulposo.
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Molécula com 300 nm	Derme, intestino, gengiva, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos.
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	Molécula com 390 nm	Córnea, osso, vasos sanguíneos, cartilagem, gengiva.
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	Molécula com 300 nm	Cartilagem, disco intervertebral.
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[2\alpha(IV)]$	Molécula com 390 nm de estrutura não fibrilar	Lâmina basal
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	Molécula com 150 nm	Tecido intersticial e associado ao colagénio tipo I
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Molécula com 450 nm	Epitélio
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$	Molécula com 130 nm	Algumas células endoteliais
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	Molécula com 200 nm	Cartilagem e associado ao colagénio tipo II

2.4.3. Síntese e estrutura do colagénio tipo I

O tipo de colagénio mais abundante é o colagénio tipo I, que constitui grande parte da matriz óssea, podendo também ser encontrado na pele, nos tendões, na córnea, nos vasos sanguíneos, etc. [18].

O colagénio do tipo I é constituído por três cadeias peptídicas, sendo cada uma designada de cadeia alfa (cadeia α). Duas dessas cadeias α são idênticas, estando orientadas na mesma direção, sendo designadas de cadeias $\alpha 1$, enquanto que, a terceira cadeia constituinte do colagénio tipo I é ligeiramente diferente, relativamente à sua composição química estando orientada na direção oposta das outras duas, sendo designada de cadeia $\alpha 2$ [18, 94]. Cada uma das cadeias é constituída por mais do que mil aminoácidos, sendo a tripla hélice constituída pela repetição de um triplete (Gly-X-Y), onde o Gly representa a Glicina e na posição X e Y, são maioritariamente encontradas a prolina (Pro) e a hidroxiprolina (Hyp) respetivamente [16, 96-99].

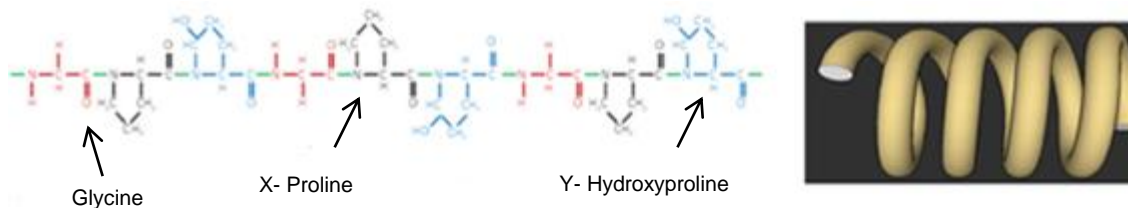


Figura 11- Estrutura e constituição de uma α -hélice constituinte do colagénio [adaptado de [99]].

As três cadeias alfa estão interligadas em forma de tripla hélice, através de pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas, originando a designada molécula de tropocolagénio [18, 31, 94] (Figura 12). As pontes de hidrogénio estão maioritariamente associadas ao grupo da hidroxiprolina, pelo que estas ligações proporcionam estabilidade à tripla hélice [98].

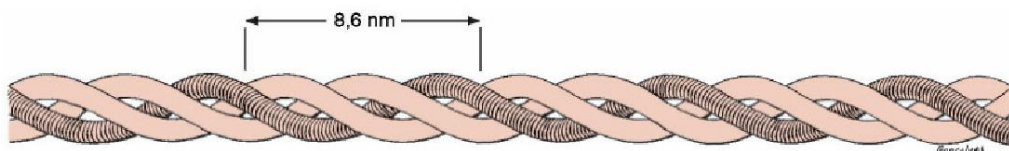


Figura 12- Molécula de tropocolagénio do tipo I, em que as cadeias mais claras representam as cadeias $\alpha 1$ e a mais escura representa a cadeias $\alpha 2$ [adaptado de [30]].

Não existe um consenso na literatura acerca dos comprimentos e diâmetros da molécula de colagénio, pelo que os valores apresentados por diversos autores [92, 94, 98] para os mesmos se situam entre os 200 a 400 nm de comprimento e um diâmetro de cerca 1,4 a 1,5 nm.

O colagénio tipo I é sintetizado a partir de vários tipos de células incluindo os fibroblastos e osteoblastos, ocorrendo a formação das cadeias polipeptídicas (cadeias α) no retículo endoplasmático rugoso. Três destas cadeias α acabam por se alinhar e organizar numa estrutura helicoidal originando a molécula de pró-colagénio (Figura 13 (a)). Cada uma das cadeias α que se forma e constituem a estrutura em tripla hélice do pró-colagénio apresentam numa das sua extremidade um grupo amina e na outra um grupo carboxilo, que são responsáveis por garantir um arranjo correto das cadeias polipeptídicas aquando da formação da tripla hélice. O pró-colagénio é levado do complexo de Golgi para a membrana extracelular a partir de vesículas onde é secretada para o meio extracelular. Neste são então removidos os grupos de amina e carboxilo das extremidades por protéases, passando a obter-se uma molécula que tem a capacidade da formação de fibrilhas sendo esta designada de tropocolagénio [30, 99, 100]. Após a formação do tropocolagénio são removidos alguns aminoácidos constituintes da molécula, para que esta se possa reorganizar e ligar a outras moléculas de tropocolagénio, formando assim as designadas fibrilhas de colagénio.

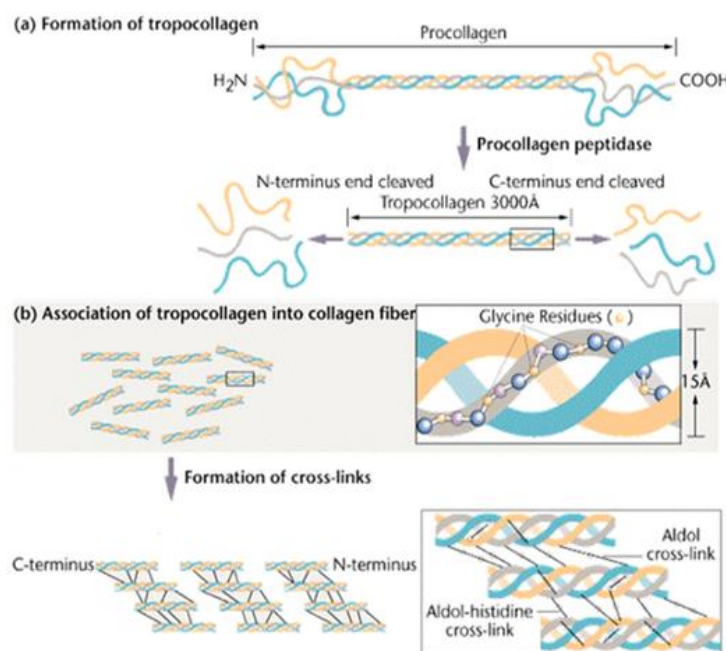


Figura 13- Formação do tropocolagénio e das fibrilhas de colagénio [adaptado de [101]]

À medida que as moléculas de tropocolagénio se vão interligando para constituir as fibrilhas, formam-se regiões de sobreposição (zonas mais escuras) e regiões lacunares (zonas mais claras), que originam as típicas bandas periódicas de aproximadamente 67 nm características das fibrilhas de colagénio [16, 30, 76, 99, 100] (Figura 14).

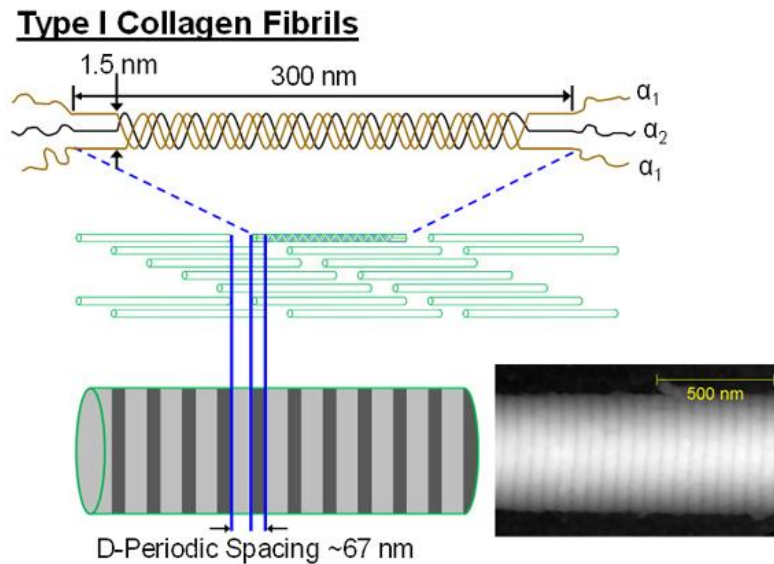


Figura 14- Organização das fibrilhas de colagénio representando as bandas periódicas características das fibrilhas do colagénio tipo I [adaptado de [99].

As fibrilhas de colagénio por sua vez juntam-se dando origem às designadas fibras de colagénio [31].

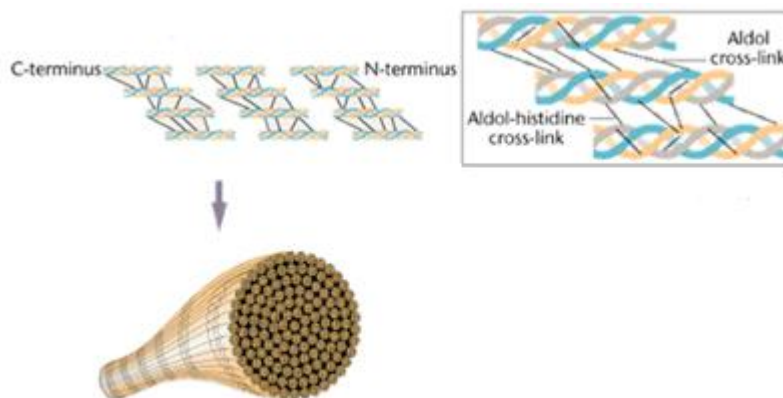


Figura 15- Formação das fibras de colagénio, a partir das fibrilhas [adaptado de [101]].

Na figura 16 encontra-se um esquema completo das diversas estruturas constituintes do colagénio, desde as mais simples (cadeia α) até às mais complexas (fibras).

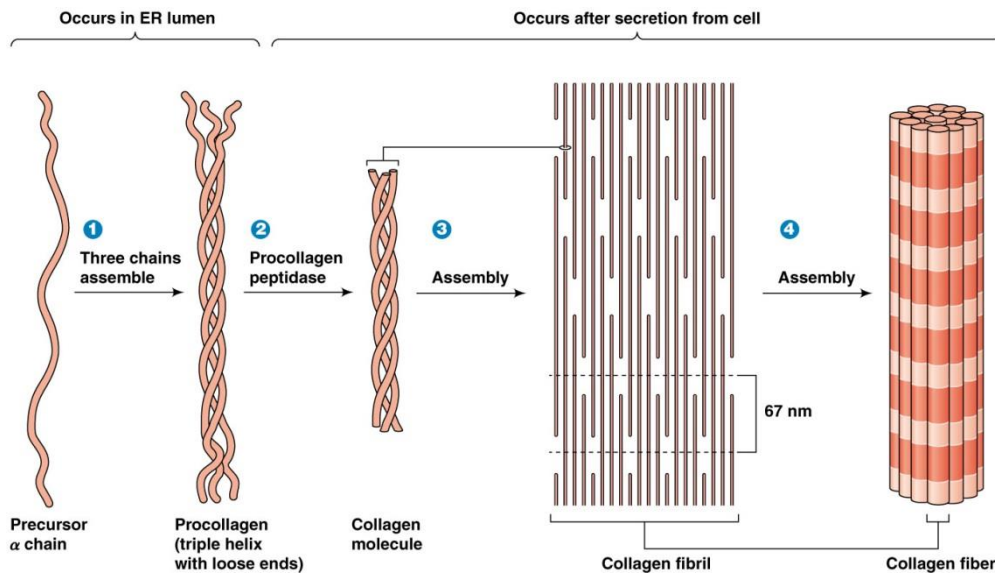


Figura 16- Esquema da organização do colagénio fibrilar tipo I [adaptado de [102]].

➤ Desnaturação do colagénio

Geralmente a estrutura adquirida pelas proteínas dependem do seu desempenho e função no meio celular. As diferenças das condições em que normalmente se encontram inseridas (meio celular), podem provocar a designada desnaturação, onde ocorre a rotura parcial da molécula, ou seja, ocorre a quebra das ligações que mantêm a estrutura secundária das proteínas.

No caso do colagénio que tem uma estrutura em tripla hélice, geralmente as ligações peptídicas são mantidas, sendo a quebra das ligações de hidrogénio pertencentes à água que o constitui, normalmente um dos primeiros processos que ocorre na degradação do colagénio [96, 103].

Esta modificação a nível estrutural da proteína pode ser provocada pela intervenção de diversos fatores externos, tais como por exemplo o aumento da temperatura, diferenças de pH, entre outros que podem levar a este processo de reorganização estrutural.

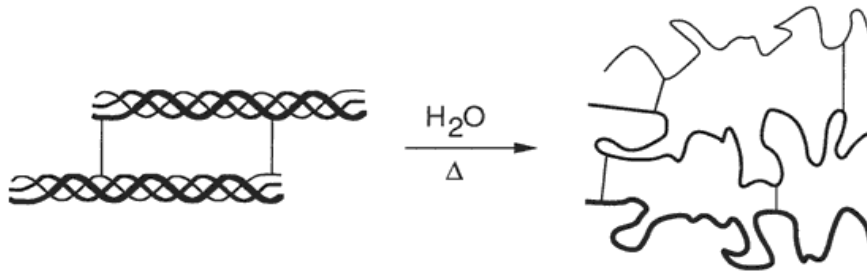


Figura 17- Processo de desnaturação do colagénio, ou seja, destruição da estrutura secundária do colagénio. [adaptado de [104]]

2.4.4. Principais aplicações e estudos realizados com o colagénio na área médica

O colagénio é sem dúvida um biomaterial extremamente útil, devido às suas excelentes e superiores propriedades de biocompatibilidade, que este apresenta comparativamente a outros polímeros naturais como por exemplo a albumina. Acrescentam-se a estas propriedades suas características biológicas, tal como a biodegradabilidade [19]. Este conjunto de características torna o colagénio fortemente atrativo para aplicações médicas [19]. Assim, este polímero natural tem sido aplicado em suturas, cirurgias plásticas, compósitos dentais, na área oftalmológica (lentes de contacto), sistemas para libertação controlada de fármacos, matrizes biodegradáveis, como plataformas para a regeneração da pele em casos de queimaduras, entre outros [16, 19, 105, 106]. Além disso, o colagénio também tem utilidade no desenvolvimento de válvulas, vasos sanguíneos e traqueias artificiais.

Dos diversos tipos de colagénio existentes, como o colagénio tipo I é o que aparece em maiores proporções na matriz extracelular no organismo, este é utilizado como uma fonte primária de processamento de biomateriais para substituição e regeneração de tecidos, como é o caso do osso e cartilágneo, etc. A aplicação do colagénio na engenharia de tecidos sobe por exemplo a forma de *scaffolds*, deve-se ao facto de estas plataformas fornecerem informações biológicas necessárias para promover a adesão, proliferação e migração celular que leva, conseqüentemente, à regeneração dos tecidos e feridas [16]. Desta forma, o colagénio tem sido estudado na engenharia do tecido ósseo como forma de tratamento de defeitos ósseos e no caso da reparação da pele [16, 107].

Como a maioria das células no organismo está rodeada pela matriz extracelular e esta contém proteínas, como é o caso do colagénio, que desempenham um papel importante no crescimento e desenvolvimento de axónios, o colagénio é assim também utilizado na

regeneração nervosa [108]. Além da vertente nervosa o colagénio tem sido explorado na reparação do tecido ósseo [15, 74].

Capítulo 3

Metodologias e técnicas de caracterização

3. Metodologias e técnicas de caracterização

Neste capítulo descrevem-se o método de preparação dos filmes e as técnicas de caracterização que foram utilizadas neste estudo.

3.1. Preparação dos filmes finos de colagénio

Os filmes finos de colagénio foram preparados a partir do colagénio tipo I de rato da First Link UK Ltd. (referência: 60-30-810), tratado com clorofórmio e dissolvido em ácido acético [109], uma concentração de 2,05 mg/ml da proteína.

Uma vez que a concentração de colagénio na solução é baixa para a preparação dos filmes, foi necessário recorrer à evaporação do solvente a cerca de 37° C, para conseguir desta forma aumentar a concentração da proteína na solução, para aproximadamente 10 mg/ml.

Após a obtenção de uma solução mais concentrada de 10 mg/ml representando uma concentração de aproximadamente 1 % (m/v) de colagénio, procedeu-se à preparação dos filmes sobre um substrato de vidro. O substrato são lamelas de vidro da Marienfeld-Superior Germany, com 13 mm de diâmetro e cerca de 1 mm de espessura.

Para a preparação dos filmes, utilizou-se então uma micropipeta da Orange Scientific, e em cada lamela de vidro foi colocada uma gota de 125 µl de solução, de forma a tentar obter um filme o mais homogéneo possível. Após a colocação das gotas de solução sobre o substrato, as amostras foram colocadas na estufa à temperatura de 37 °C e por 5 h, de forma a evaporar o solvente e apenas ficar sobre a lamela de vidro um filme fino colagénio com cerca de 2 µm de espessura. (Figura 18)

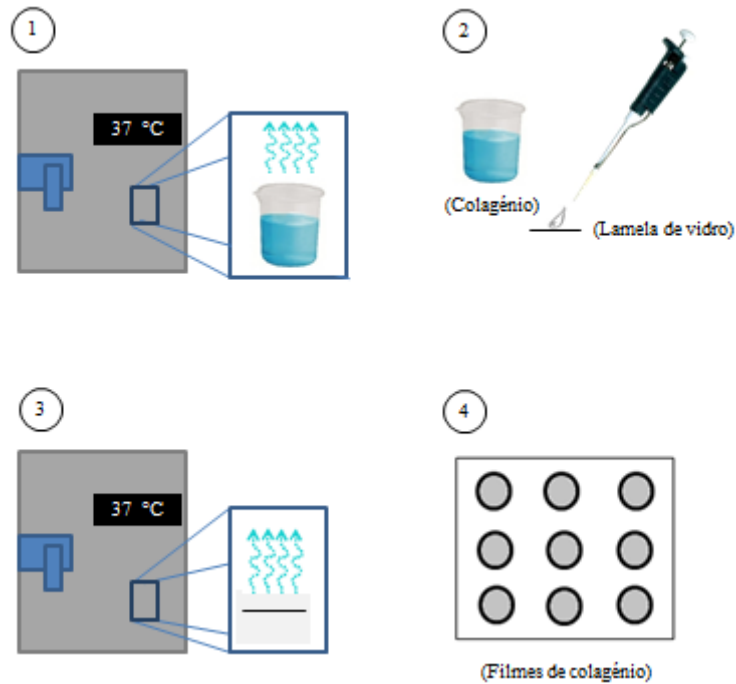


Figura 18- Esquema da preparação dos filmes de colagénio usada neste trabalho: 1) evaporação do solvente, para aumentar a concentração da solução; 2) colocação de uma gota de 125 µl em cada lamela de vidro (substrato), da solução concentrada (1 % (m/v)); 3) evaporação do restante solvente, para obter apenas uma camada fina de colagénio na lamela de vidro; 4) filmes finos de colagénio.

3.2. Polarização dos filmes finos de colagénio

Neste trabalho, as amostras foram modificadas eletricamente, tendo estas sido polarizadas. O processo de polarização é um método de reorganização dos dipolos do material através da aplicação de um campo elétrico e, geralmente, na presença de temperatura que facilita este processo [20]. Existem vários métodos que podem ser utilizados para polarizar materiais, tendo-se recorrido neste caso, para a polarização dos filmes de colagénio, ao método da descarga de Corona.

Neste método como se pode observar na figura 19 a amostra é colocada entre dois eletrodos assimétricos: uma ponta e um prato, que é uma placa de aquecimento que permite controlar a temperatura. Este processo é realizado em meio de árgon ou ar. Quando é aplicado um campo elétrico entre a ponta e o prato as moléculas do gás à volta da ponta do eletrodo ionizam-se, aceleram e embatem na superfície do polímero, deixando a sua carga dentro do mesmo [20, 110, 111].

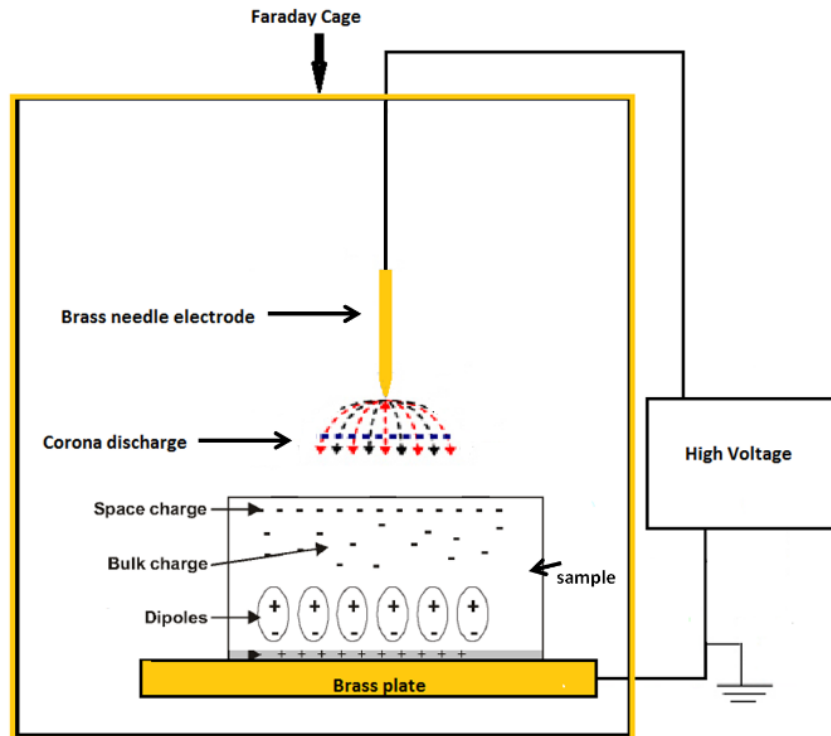


Figura 19- Sistema de funcionamento do método da descarga de Corona. [Imagem gentilmente fornecida por Nathalie Barroca de um artigo ainda em submissão [112]]

A polarização dos filmes de colagénio foi realizada de acordo com as seguintes condições: 1. Subida da temperatura até aos 40 °C, sem voltagem aplicada; 2. atingidos os 40 °C procedeu-se à aplicação de um campo elétrico (de 9 KV), pelo período de 30 min. Ao fim deste tempo diminui-se a temperatura até aproximadamente à temperatura ambiente mantendo a aplicação do campo. O tempo de descida da temperatura é de cerca de 45 minutos.

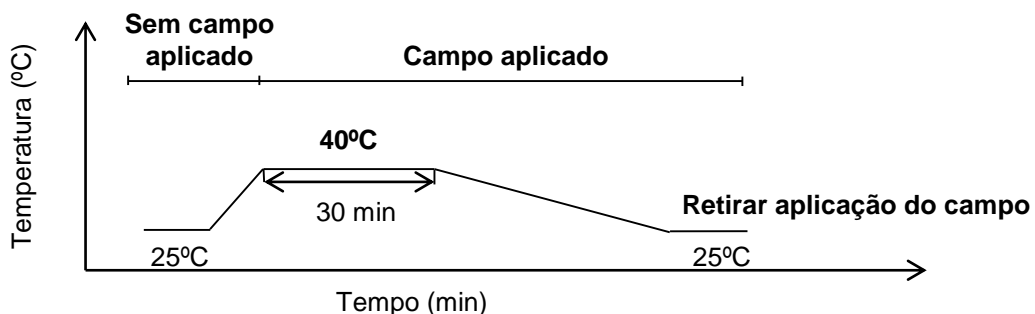


Figura 20- Condições de polarização das amostras pelo método do Corona.

3.3. Técnicas de caracterização

3.3.1. Electroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio

Esta técnica visa a identificação e separação de macromoléculas, tais como as proteínas, relativamente aos seus tamanhos e propriedades físicas [113, 114]. Baseia-se na migração de espécies eletricamente carregadas, através de uma matriz de um gel, quando lhe é aplicado um potencial elétrico [113].

O processo de eletroforese normalmente utilizado é o designado por *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) que consiste no uso de dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um surfactante aniónico que desnatura as proteínas, ou seja, leva à degradação das estruturas mais complexas, tais como a organização secundária, terciária e quaternária. Este surfactante para além de levar à quebra das pontes de dissulfido reduzindo a proteína para uma cadeia linear peptídica, confere-lhe uma carga negativa, proporcionando assim a possibilidade de migração da macromolécula [113, 115].

A matriz de gel geralmente utilizada neste procedimento para o caso do colagénio é a poli(acrilamida), que se trata de um polímero constituído a partir dos monómeros de acrilamida [95]. Esta matriz não é sólida, apresentando-se como uma espécie de labirinto que permite a migração das espécies segundo os seus tamanhos e pesos moleculares [114]. (Figura 21)

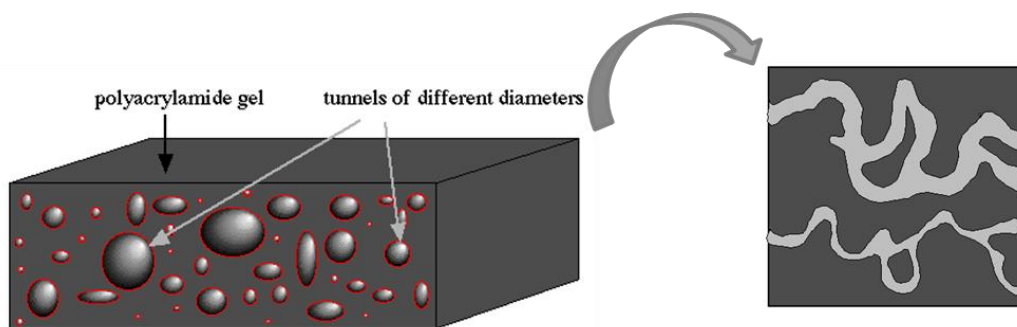


Figura 21- Matriz de gel de poli(acrilamida) utilizado para a realização do SDS-PAGE. [adaptado de [114].

A velocidade de migração da molécula em questão depende da sua massa e da quantidade de cargas que a mesma contém. Como a migração das proteínas negativamente carregadas ocorre na direção do eléctrodo positivo ou cátodo, quanto maior for a massa molecular, mais afastada do cátodo, isto é, mais próxima do ânodo esta fica [113]. (Figura 22)

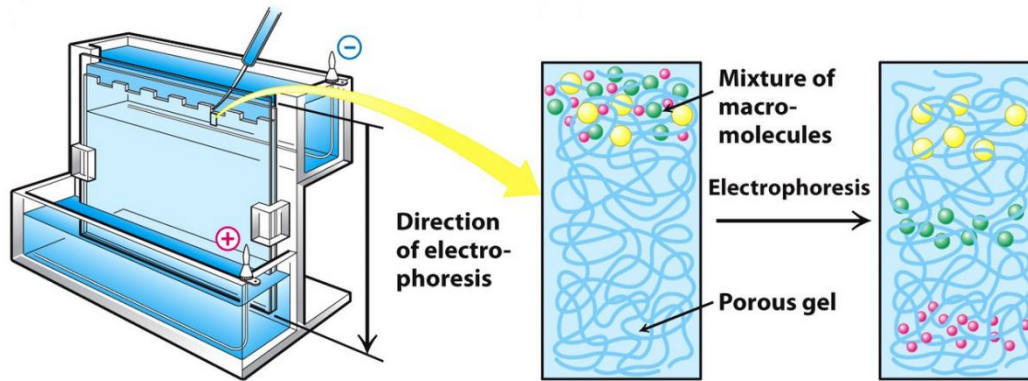


Figura 22- Modo de funcionamento SDS-PAGE. [adaptado de [116]]

Após a migração das partículas obtém-se um gel com várias bandas de larguras diferentes e correspondentes a pesos moleculares variados, permitindo desta forma a identificação das diversas macromoléculas presentes [114].

Para a realização deste ensaio o colagénio foi diluído de 1:1 com um tampão, que contém SDS e beta mercaptoetanol, para a quebra das pontes de dissulfido, sendo posteriormente aquecido a 95 °C durante 5 minutos. De seguida a amostra foi adicionada aos poços do gel de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE gel) a 7.5% (m/v) e após o ensaio o gel foi corado com azul de *Coomassie* (que cora as bandas do gel).

Os pesos moleculares das bandas obtidas são comparados com um padrão, para poderem ser identificadas as moléculas constituintes da proteína. Neste trabalho, o padrão utilizado foi da *Bio-Rad's natural protein*.

Esta técnica foi realizada com o principal objetivo de determinar quais as subunidades que a solução inicial de colagénio contém e quais os respetivos pesos moleculares aproximados.

3.3.2. Calorimetria Diferencial de varrimento

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica de análise térmica que permite analisar a estabilidade termodinâmica do material e detetar assim as suas transições térmicas [117]. Quando se trata de polímeros, as curvas de DSC geralmente permitem determinar temperaturas relevantes como as temperaturas de transição vítrea, fusão, degradação e cristalização. Nesta técnica as transições térmicas são obtidas a partir de uma comparação que é realizada entre um material de referência, sendo geralmente utilizados materiais inertes, que não sofrem alterações às mesmas temperaturas a que a amostra é submetida [118].

Neste trabalho a DSC foi realizada para perceber como se comporta termicamente o colagénio em estudo e conhecer a temperatura a que ocorre a transição térmica, (desnaturação) do mesmo. Para realização deste ensaio, foi necessário proceder à evaporação da solução de colagénio no cadinho de alumínio, geralmente utilizado para a execução das medidas de DSC.

Numa primeira fase foram colocados 50 μl da solução de colagénio com uma concentração de aproximadamente 1 % (m/v), através de uma micropipeta da Orange Scientific no cadinho, tendo sido posteriormente adicionados 20 μl de solução até à obtenção de uma quantidade final de cerca de 3 mg de material no cadinho para realização do ensaio.

A amostra foi então selada dentro do cadinho de alumínio tendo sido aquecida na gama dos 20 °C até aos 200 °C, com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min, numa atmosfera de nitrogénio (N_2). Este ensaio foi realizado num equipamento Shimadzu DSC-50.

3.3.3. Microscopia eletrónica de varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica de caracterização da microestrutura de materiais bastante utilizada.

Esta técnica baseia-se no bombardeamento da amostra com eletrões que após interação com a matéria origina emissões de raios-X, eletrões secundários, entre outros, que são posteriormente captados gerando uma imagem com informação sobre a microestrutura do material e também da sua superfície. A interação com o feixe de eletrões é otimizada se o material for condutor. Nos casos em que os materiais não são condutores, como é o caso do colagénio, recorre-se à deposição de um material condutor, geralmente o carbono ou o ouro [119].

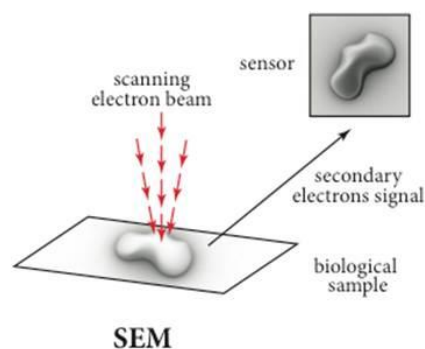


Figura 23- Modo de funcionamento da microscopia eletrónica de varrimento [120].

Neste trabalho o SEM foi utilizado para analisar as características topográficas dos filmes e para obter a espessura dos mesmos. Pode observar-se na figura 24 a preparação das amostras.

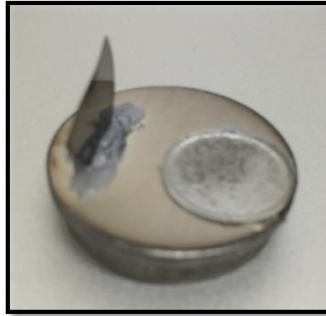


Figura 24- Amostras preparadas para o SEM, com a deposição de ouro.

Além do uso das técnicas de SEM foram obtidas imagens óticas com a ajuda de um microscópio ótico Olympus IX-81.

3.3.4. Microscopia de Força Atómica

A microscopia de força atómica é uma técnica de microscopia que tem sido aplicada em áreas diversificadas, materiais, biologia, química e física, para qualificar e quantificar parâmetros microestruturais e em particular analisar superfícies [121].

A resolução subnanométrica, ou seja atómica, que é conseguida com o AFM e o facto de este possibilitar medidas em condições fisiológicas têm sido factores que levam a que esta técnica seja utilizada para o estudo de moléculas biológicas, tais como proteínas e tecidos. Este tipo de microscopia proporciona a aquisição de mapas topográficos superficiais tridimensionais das amostras que por sua vez permitem obter medidas de rugosidades, detetar modificações a nível da superfície após um tratamento superficial, entre outros [119, 122].

Esta forma de caracterização consiste no varrimento da amostra com uma ponta que está fixa a um *cantiliver* sensível às pequenas variações das forças de interação entre a ponta e a superfície, sendo as deflexões do mesmo detetadas por um laser. Deste modo, quando a ponta segue os movimentos dos contornos da superfície da amostra, o feixe de laser que é refletido para o fotodíodo, permite uma medida

diversificada na intensidade da luz possibilitando uma distinção das zonas mais altas e mais baixas da superfície. As forças de interação entre a ponta e a superfície da amostra podem ser de natureza repulsiva ou atrativa, o que confere três modos de funcionamento ao AFM: a) modo de contacto, b) modo de não contacto e o modo intermitente. (Figura 25) [121, 122].

Neste trabalho o modo de funcionamento que foi utilizado para analisar a amostra foi o modo de contacto, em que a ponta que se encontra fixa ao *cantiliver* se mantém a uma distância apenas de alguns *Ångström* da superfície do material. Esta distância é mantida ao longo de todo o processo de monitorização das forças de interação, neste caso repulsivas, que se exercem entre a ponta e a superfície da amostra [119].

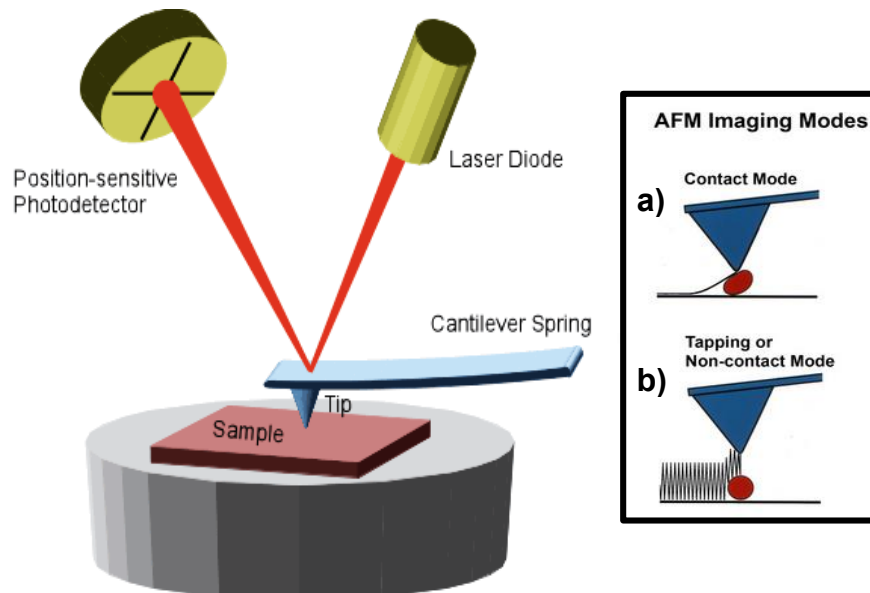


Figura 25- Modo de funcionamento da microscopia de força atômica. [adaptado de [123] e de [124]]

A força constante exercida pela ponta de silicone utilizada para o desenvolvimento deste trabalho foi de 2,8 N/m tendo esta uma altura de aproximadamente 10-15 μm e com um raio de curvatura de 25 nm. Relativamente ao *cantilever*, este apresentava uma espessura de 3,0 μm , uma largura média de 28 μm e um comprimento de 225 μm [125].

Estes ensaios foram realizados em ar, à temperatura ambiente.

3.3.5. Medidas de ângulos de contacto

O teste de molhabilidade é uma técnica que é geralmente utilizada para analisar a hidrofiliabilidade/ hidrofobicidade da superfície de um determinado material, através da capacidade de um líquido se espalhar ou absorver na superfície do mesmo [119].

O parâmetro que normalmente é medido através desta técnica é o designado ângulo de contacto, que geometricamente é definido como um ângulo que se forma da interseção de dois planos relativamente a uma tangente que se encontra na zona de contacto entre uma superfície líquida e sólida. Para além destas duas superfícies, normalmente também se encontra envolvida uma terceira fase que se trata geralmente de vapor ou ar [122, 126]. (Figura 26)

No caso dos biomateriais o ângulo de contacto é vulgarmente medido em ar, utilizando o método designado por gota *séssil*, sendo o líquido utilizado para esta análise a água. Este procedimento é normalmente realizado num aparelho que tem uma seringa com uma ponta plana, utilizada para poder aplicar a gota do solvente na superfície da amostra [122].

Após a gota ter entrado em contacto com a superfície do material, o ângulo de contacto é então determinado, através da posterior medição da altura e largura da gota. Quanto menor for o ângulo de contacto entre a superfície e o líquido utilizado maior será a hidrofiliabilidade do material, ou seja maior será a sua afinidade para com o líquido em questão. Contrariamente aos materiais hidrofílicos, o ângulo de contacto nos materiais hidrofóbicos é maior [119].

Neste trabalho as medidas dos ângulos de contacto foram realizadas em condições estáticas à temperatura ambiente, usando gotas de 2 µl de água destilada. Desta forma foram analisadas diversas amostras de cada conjunto (filmes de colagénio como processados, não polarizados e filmes de colagénio (+) e (-)), tendo sido depositado três gotas em cada amostra, de forma a obter uma média.

Esta técnica foi utilizada para avaliar se existem diferenças na hidrofiliabilidade dos filmes finos de colagénio, quando estes são submetidos à polarização. O equipamento utilizado para realizar estas medidas foi o *USA Kino Industry- optical angle contact meter and interfacial tensi counter*.



Figura 26- Ângulos de contacto formados em superfícies de materiais a) hidrofílicos e b) hidrofóbicos [adaptado de [127]].

3.3.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier por refletância total atenuada

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, também designada por FTIR, é uma análise vibracional geralmente realizada aos materiais para determinar as estruturas, grupos e arranjos químicos que se encontram presentes nos mesmos [119, 128, 129]

Relativamente aos polímeros, o FTIR é utilizado para caracterizar a microestrutura e morfologia polimérica, a conformação da cadeia, ligações químicas, entre outros, tendo também vindo a ser utilizado como uma forma de analisar estruturas complexas como é o caso da estrutura secundária das proteínas, sendo possível detetar modificações na mesma [130, 131].

Esta técnica baseia-se na incidência de um feixe de radiação infravermelho na amostra, que a absorve, podendo as ligações químicas do material sofrer alterações, tais como contrações, alongações ou distorções, conforme a quantidade de energia absorvida a cada comprimento de onda, o que origina o espectro de infravermelho [119, 129].

Neste trabalho o FTIR foi realizado, com o principal objetivo de avaliar eventuais diferenças nas ligações/ arranjos moleculares dos filmes de colagénio polarizados e não polarizados. Esta técnica foi realizada no modo de refletância total atenuada (ATR), tendo os espetros de ATR-FTIR sido obtidos através de um equipamento Bruker Tensor 27, entre os 4000 cm^{-1} e os 300 cm^{-1} .

3.3.7. Estudo da adesão celular nos filmes de colagénio polarizados e não polarizados

Este trabalho foi realizado em colaboração com investigadores da Secção Autónoma das Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro, tendo os ensaios celulares sido realizados no Departamento de Biologia, da Universidade de Aveiro.

Para estes ensaios foram utilizadas as seguintes células osteoblásticas: as MG-63, do tipo tumoral provenientes de osteossarcomas humanos e as hOB, que são osteoblastos humanos. As células foram depositadas nos poços das placas contendo os filmes de colagénio polarizados, filmes de colagénio não polarizados, nas lamelas de vidro (sem os filmes de colagénio) e diretamente aos poços das placas (plástico-poliestireno). O ensaio celular preliminar foi realizado em triplicado.

➤ Esterilização dos filmes de colagénio

A esterilização dos filmes de colagénio foi realizada dentro de uma câmara de fluxo laminar (Braun, Modelo M51424/2). Os filmes de colagénio foram colocados em placas de 24 poços e imersos em etanol 70% durante 5 minutos. Posteriormente, o etanol foi aspirado e os filmes foram lavados cinco vezes com água desionizada e estéril. De seguida foram lavados cinco vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS de *phosphate-buffered saline solution*) e por fim os filmes foram lavados três vezes com o meio de cultura celular utilizado para a manutenção das células.

➤ Manutenção da cultura celular:

- Células MG-63

O meio de cultura utilizado para a linha celular MG-63 (*Human osteosarcoma derived MG-63 cell line (ATCC CRL-1427)*) foi o meio essencial mínimo (α -MEM) que contém 1% de aminoácidos não-essenciais com sais Earle (*Earle's Non-Essential Amino Acids* (NEAA)) e 2,2 g/L bicarbonato de sódio. A este meio de cultura foram adicionados, posteriormente na câmara de fluxo laminar, os seguintes reagentes: 2mM L-glutamina, 10% FBS, e 1% penicilina/estreptomicina. O tubo contendo as células MG-63 congeladas foi colocado na câmara de fluxo laminar para descongelar à temperatura ambiente (aproximadamente durante 10 minutos). Posteriormente, 0,5 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao tubo com as células MG-63 e gentilmente, ressuspenderam-se as células no meio de cultura. Adicionaram-se 14,5

mL de α -MEM numa placa de petri e posteriormente a suspensão celular. A placa foi colocada na incubadora (37 °C, 5% CO₂, atmosfera humedecida). Após 12h o meio foi substituído para remoção de vestígios de Dimetilsulfóxido (DMSO). O meio foi substituído de dois em dois dias até as células atingirem uma confluência de 60%. As células foram divididas quando a cultura atingiu os 80% de confluência utilizando 0.05%tripsina/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

- **Células hOB**

Relativamente às células hOB (*Human osteoblasts (ECACC (406-05a))*), o meio de cultura utilizado foi o *osteoblasts growth medium (OGM) (ECACC 06091517)* suplementado e esterilizado. O tubo contendo as células hOB congeladas foi colocado na câmara de fluxo laminar para descongelar à temperatura ambiente (aproximadamente durante 10 minutos). Posteriormente, 0,5 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao tubo com as células hOB e gentilmente, ressuspenderam-se as células no meio de cultura. Adicionaram-se 19,5 mL de OGM no frasco 75 cm² com filtro e posteriormente a suspensão celular. A placa foi colocada na incubadora (37 °C, 5% CO₂, atmosfera humedecida). Após 12h o meio foi substituído para remoção de vestígios de DMSO. O meio foi substituído de dois em dois dias até as células atingirem uma confluência de 60%. As células foram divididas quando a cultura atingiu os 80% de confluência utilizando 0,05%tripsina/EDTA.

As células hOB foram contadas utilizando um hemocítmetro e adicionadas 5x10⁴ células/mL a cada poço das placas de 24 poços (Vf= 2mL). A placa foi mantida na incubadora (37 °C, 5% CO₂, atmosfera humedecida) durante 24 h. Após 24 h, o meio contendo as células que não aderiram aos filmes foi removido e substituído por novo meio de cultura.

- **Caracterização das culturas celulares depositadas nos filmes de colagénio**

Após 24 h, as culturas celulares foram observadas, relativamente à sua morfologia e adesão, através do microscópio ótico Olympus IX-81, por contraste de fase. Após 4 dias, as células que aderiram aos filmes e lamelas de vidro foram fixadas utilizando 4% paraformaldeído em PBS durante 15 min. De seguida procederam-se a três lavagens com PBS e à permeabilização utilizando 0,1% Triton em PBS durante 5 min. As células foram incubadas com rodamina-faloidina Alexa Fluor 568 (Invitrogen), diluída 1:1000 em PBS contendo 1% BSA durante 20 min no escuro, para a observação de filamentos de F-actina. Após três lavagens com PBS de 5 minutos

cada, as células foram incubadas com o anticorpo anti-FAK (*focal adhesion kinase*) (Invitrogen), diluído 1:400 em PBS durante 12 h a 4 °C, e após três lavagens com PBS adicionou-se Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG anticorpo diluído 1:1000 à temperatura ambiente durante 45 min, para detectar os locais de adesão celular (locais de interação entre as células e o substrato). Realizaram-se três lavagens de 5 min cada e uma lavagem com água destilada e as lamelas com as células preparadas em meio de montagem, DAPI-plus VECTASHIELD (Vector laboratories) em lâminas de vidro de 0,1mm, para a visualização dos núcleos das células. As células foram observadas através do microscópio invertido motorizado - Olympus IX-81. As imagens obtidas foram analisadas a dois níveis: qualitativo e quantitativo. A análise qualitativa permitiu a análise morfológica das células que aderiram às superfícies em termos de formação de pontos de contacto entre as células e as superfícies e também a capacidade de as células proliferarem nestas superfícies. Relativamente à análise quantitativa, esta permitiu a determinação da adesão celular, isto é, do número de células que aderiram às diferentes superfícies. A adesão celular foi avaliada através da contagem do número de núcleos das células corados com DAPI. Dez imagens por lamela foram captadas utilizando a objetiva de 10x (ampliação total = 100x). Cada imagem foi analisada através do programa computacional ImageJ 1.47 v, tendo a análise estatística posterior sido realizada recorrendo à análise de variância, (Anova one-way, post-hoc Tukey), considerando-se significativos os resultados com $p \leq 0,05$.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Constituição macromolecular da solução precursora de colagénio por SDS-PAGE

Na figura 27 encontra-se representado o resultado obtido para a electroforese SDS-PAGE. Este procedimento dá-nos informações acerca da constituição da amostra, podendo desta forma ser analisada a pureza da mesma. Para tal, os pesos moleculares aproximados foram obtidos por comparação com padrões de pesos moleculares que variam entre os 25 e os 250 kDa.

As bandas observadas para o colagénio estão relacionadas com a sua composição como heterotrímero, ou seja, pela sua constituição por duas subunidades diferentes [96]. Desta forma, a SDS-PAGE normalmente reportada na literatura para o colagénio tipo I apresenta três bandas típicas, as dos monómeros α_1 e α_2 e a banda designada por β [96, 132-134]. Os dímeros das cadeias α , ou seja, a agregação de duas cadeias α_1 ou a de uma cadeia α_1 com uma cadeia α_2 são designadas como a porção β do colagénio, sendo esta banda tipicamente observada a pesos moleculares mais elevados [96, 135].

Para além dos dímeros e das cadeias de α_1 e α_2 , pode em alguns casos ser observada, no SDS-PAGE do colagénio tipo I, uma banda no topo do gel que corresponde ao trímero, ou seja, à ligação das três cadeias (duas α_1 e uma α_2), que representa a estrutura secundária do colagénio [96, 136]. Desta forma, verifica-se que o colagénio de rato utilizado neste trabalho é composto por duas cadeias α_1 e uma α_2 , cujo peso molecular aproximado se situa entre os 100 e os 150 kDa. Estes pesos moleculares encontram-se de acordo com os referenciados na literatura para as cadeias α_1 e α_2 variando desde os 123 kDa e 126 kDa até aos 139 kDa e 129 kDa respetivamente [96, 132].

Verifica-se também que a banda que corresponde ao monómero α_1 (I) é mais larga comparativamente à do monómero α_2 (I), o que está relacionado com o facto de o colagénio tipo I ser constituído por duas cadeias α_1 e uma α_2 . Desta forma, o monómero α_1 existe naturalmente em maiores proporções, pelo que vários autores consideram que as cadeias monoméricas existem numa proporção de 2:1 [96, 137].

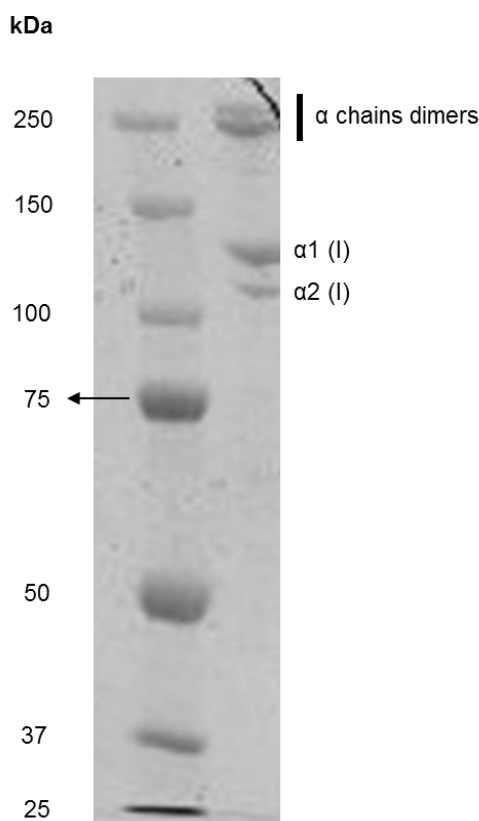


Figura 27 - SDS-PAGE do colagénio da cauda de rato tipo I, onde a primeira linha corresponde aos marcadores moleculares, enquanto que, a segunda linha representa os constituintes do colagénio. O SDS-PAGE obtido está de acordo com os resultados reportados na literatura para o colagénio do tipo I, apresentando este as três bandas típicas. As bandas situadas entre os 100 e os 150 kDa correspondem aos monómeros $\alpha 1$ e $\alpha 2$ constituintes do colagénio, podendo observar-se para além disso uma banda aproximadamente aos 250 kDa que corresponde ao dímero, ou seja, a duas cadeias $\alpha 1$ ligadas ou então à ligação de uma cadeia $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$.

4.2. Comportamento térmico do colagénio

O DSC é uma ferramenta que tem vindo a ser utilizada para analisar a degradação do colagénio, uma modificação estrutural que ocorre na proteína quando submetida a um aumento da temperatura. Esta modificação corresponde à passagem de uma forma de tripla hélice para uma estrutura enrolada normalmente designada de “*randomly coiled*”, que geralmente se expressa num efeito endotérmico bem definido no DSC [92].

Segundo a bibliografia esta transição térmica, no caso do colagénio tipo I ou em biomateriais que sejam processados a partir do mesmo, ocorre a uma temperatura típica, também designada por temperatura de desnaturação, por volta dos 60 °C [136, 138].

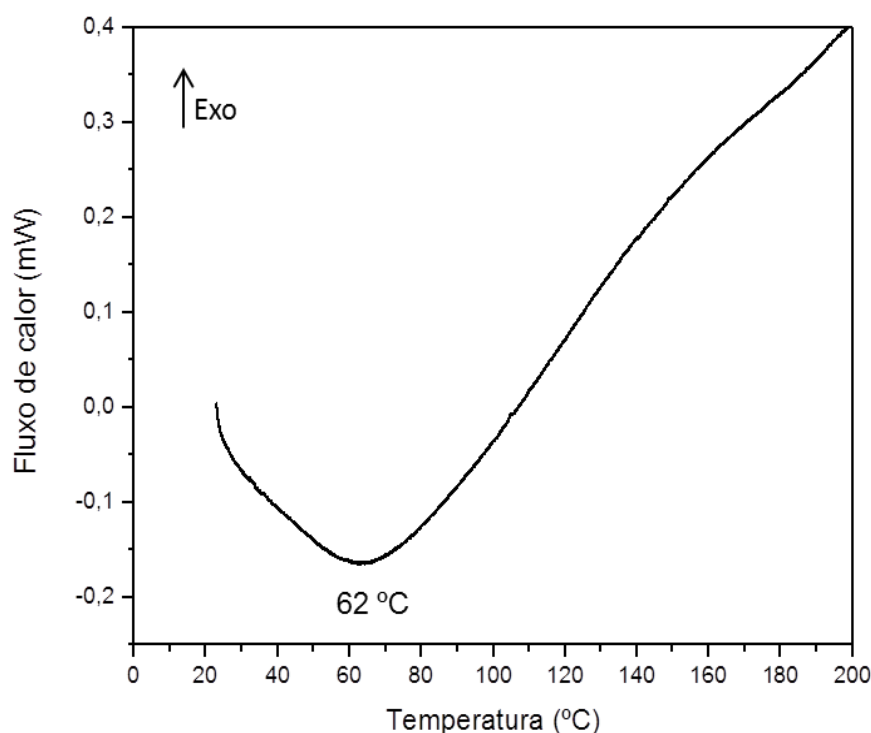


Figura 28- Curva de DSC do colagénio em estudo, na forma seca, como se encontram os filmes. O pico endotérmico aos aproximadamente 62°C vai de encontro à típica temperatura de transição de fase/ desnaturação reportada na literatura.

Na Figura 28 encontra-se representada a curva de DSC obtida para o colagénio de rato tipo I em forma seca, sendo visível um pico endotérmico aos aproximadamente 62 °C. Este valor está de acordo com os valores de temperaturas referenciados na literatura para a transição de fase do colagénio tipo I. Normalmente, quanto mais elevada for a temperatura de desnaturação, mais resistente é a molécula relativamente à sua degradação.

Existem diversos factores químicos e físicos que podem influenciar a temperatura de desnaturação desde variações no pH, radiação ultravioleta ou iónica, calor, reticulação (*crosslinking*) entre outros [133, 139, 140].

A largura do pico de DSC é normalmente uma indicação da distribuição das moléculas constituintes do colagénio, que apresentam estabilidades térmicas diferentes. Deste modo, quanto mais largo for o pico, maior será a variabilidade de moléculas com estabilidades térmicas diferentes [141, 142].

Analisando o gráfico de DSC obtido, verifica-se que o pico é bastante mais largo, que os picos endotérmicos referenciados na literatura. Tal poderá estar relacionado com o facto de os filmes de colagénio processados a partir do método descrito neste trabalho não apresentarem uma estrutura fibrilar bem definida, sendo constituídos por

uma mistura de moléculas (monómeros), que apresentem comportamentos térmicos diferentes.

Esta informação vai de encontro ao resultado obtido pelo SDS-PAGE, que indica que o colagénio é constituído por diversas cadeias polipeptídicas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$), o que está relacionado com a constituição heterotrimérica desta proteína.

4.3. Caracterização morfológica dos filmes de colagénio

✓ Microscopias eletrónica de varrimento e ótica

Na Figura 29 estão representadas as micrografias dos filmes finos de colagénio obtidos, a partir do método de *drop-casting* sobre uma lamela de vidro.

As imagens a) e b) representam uma secção transversal da amostra, permitindo desta forma obter para os filmes a espessura aproximada de 2 μm .

A imagem c) possibilita a visualização da superfície do filme de colagénio, sendo esta relativamente homogénea, apresentando no entanto algumas irregularidades responsáveis por certa rugosidade nos filmes. Este tipo de superfície para os filmes de colagénio também foi observado por Giuseppe Falini *et al.*, [93] que caracterizou morfológica, química e fisicamente regiões não helicoidais de filmes de colagénio do tipo I.

As superfícies rugosas e com a ausência de microestruturas fibrilares tipicamente observadas para os materiais processados a partir do colagénio, também foram observadas por A.G.B. da Cruz *et al.*, [92] sendo o colagénio utilizado aniónico, pelo que consideraram ser esta a explicação para o facto de não se terem formado fibrilhas quando neutralizaram o pH da solução.

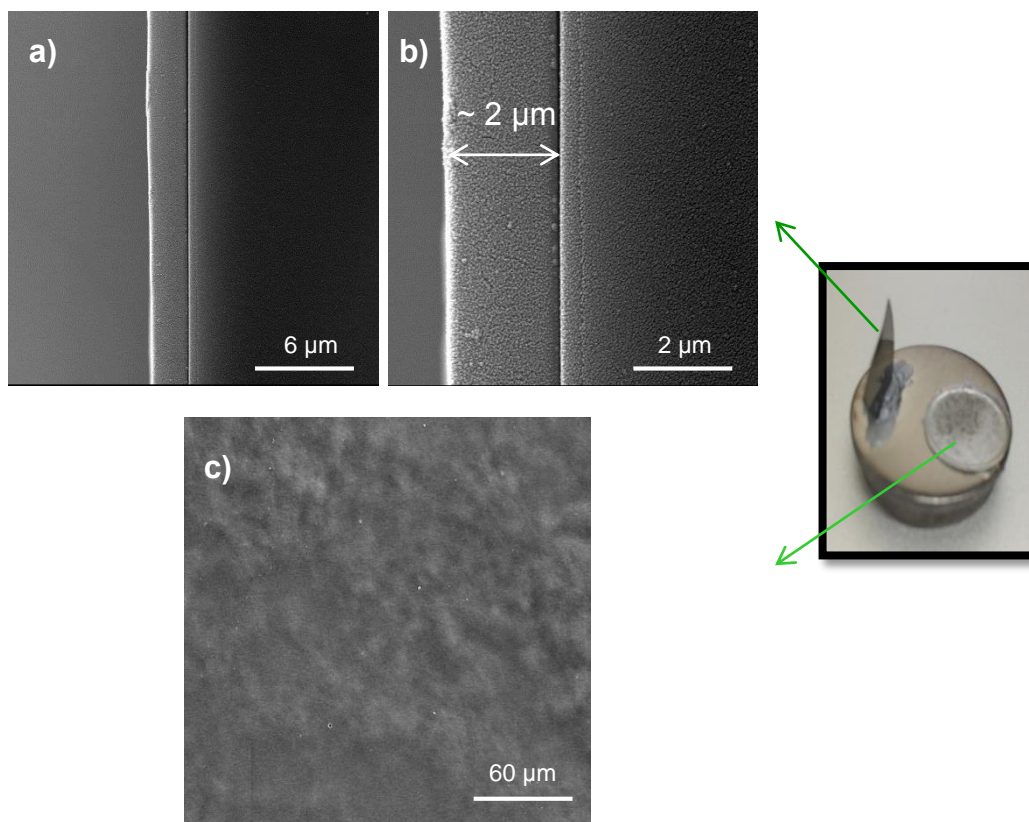


Figura 29- Micrografias de microscopia eletrônica de varrimento dos filmes de colagénio: as imagens a) e b) representam uma secção transversal do filme, sendo possível obter a espessura aproximada, 2 μm , dos filmes de colagénio. A imagem c) é uma representação da superfície dos filmes, sendo esta suave, com a presença de alguma irregularidades, que conferem rugosidade à superfície dos filmes.

A análise da superfície dos filmes de colagénio também foi realizada através do microscópio ótico Olympus IX-81 representando-se na figura 30 as micrografias óticas obtidas.

Comparando as imagens a) e b) da micrografia 30, as diferenças existentes entre a superfície da lamela de vidro que é utilizada como substrato e da superfície dos filmes de colagénio, tornam-se evidentes.

Enquanto que, a lamela de vidro apresenta uma superfície lisa sem qualquer irregularidade, o filme de colagénio apresenta-se irregular, indicando a existência de rugosidade nos mesmos.

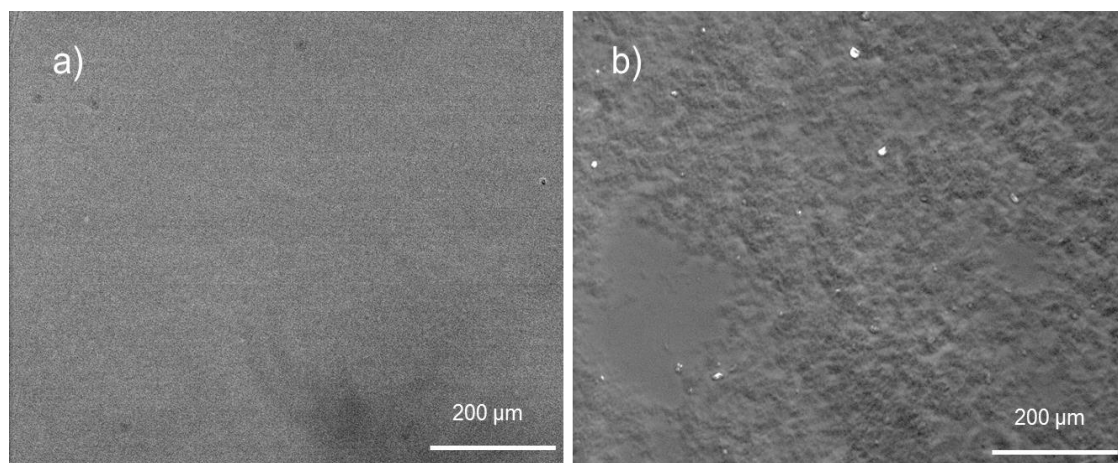


Figura 30- Micrografias óticas: a) lamela de vidro que é utilizada como substrato sobre o qual é depositado o filme de colagénio, sendo esta lisa sem irregularidades e b) superfície do filme de colagénio, onde é visível a rugosidade nos mesmos.

Para avaliar a configuração estrutural e superfície dos filmes de colagénio foram também realizadas observações por microscopia de força atómica, cujos resultados são apresentados na figura 31.

Tal como observado por microscopia eletrónica de varrimento, também por AFM não são visíveis quaisquer estruturas fibrilares nas imagens morfológicas. Existem diversos trabalhos onde a microscopia de força atómica torna visível, as estruturas fibrilares típicas do colagénio tipo I [143-146]. Geralmente é possível obter imagens de fibrilhas de colagénio isoladas numa área de varrimento entre os 1-5 μm , onde se tornam visíveis as bandas periódicas de aproximadamente 67 nm típico das fibrilhas de colagénio [144, 147, 148]. Neste trabalho foram realizadas várias tentativas de obter imagens na gama dos 1-5 μm , no entanto, devido à elevada rugosidade das amostras não foi possível obter imagens com resoluções adequadas, para a sua análise.

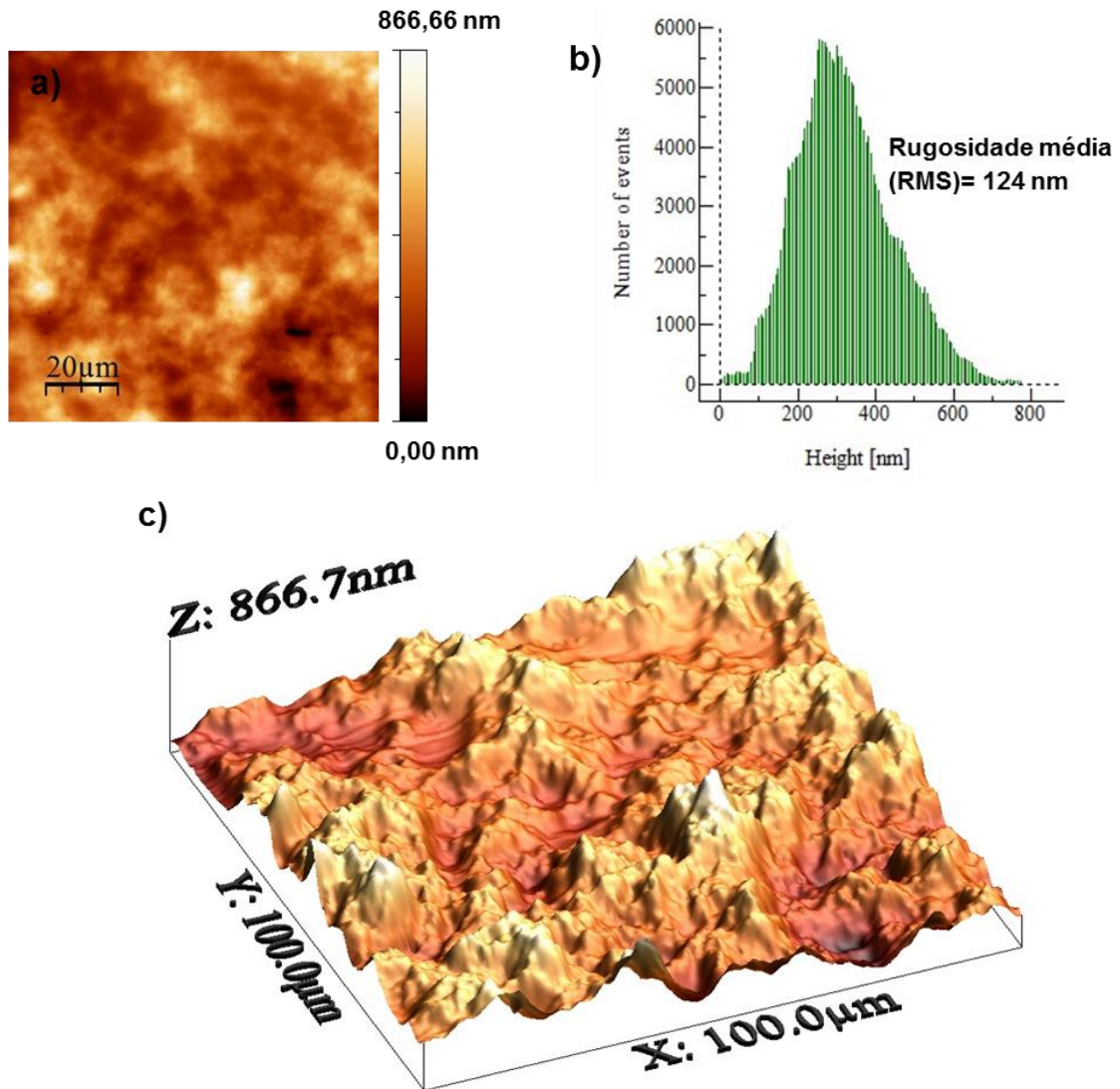


Figura 31- Imagem de AFM de uma das áreas de varrimento realizados a um dos filmes de colagénio da a) topografia, b) distribuição e valor médio de rugosidade medido numa área de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ e c) imagem 3D da superfície da amostra.

Para além da microscopia de força atômica ter sido utilizada como uma ferramenta adicional para a análise estrutural e superficial, esta também foi utilizada como uma forma de quantificação da rugosidade, que é um parâmetro fundamental na biocompatibilidade.

A rugosidade é considerada como uma medida das irregularidades da superfície de um material, que podendo ser classificada em diversas categorias, macro-rugosidade, se se encontra na gama dos $100 \mu\text{m}$ até milímetros; a micro-rugosidade, cuja gama vai desde os 100 nm até aos $100 \mu\text{m}$ e por fim a nano-rugosidade que é característica de irregularidades abaixo dos 100 nm [149].

As imagens a) e b) da figura 31 representam respectivamente a morfologia e a distribuição das medidas de rugosidade para uma das áreas de varrimento efetuadas a uma das amostras analisadas. A rugosidade média obtida para os filmes é de aproximadamente 111 ± 20 nm, encontrando-se esta na microescala.

A rugosidade observada para as amostras poderá estar relacionada com o método utilizado para a preparação das amostras, que se baseou na evaporação do solvente sobre lamelas de vidro. Nesta metodologia, dependendo do substrato e do solvente, a evaporação não é realizada de uma forma homogênea por toda a superfície, pelo que, o solvente evapora mais rapidamente em determinadas zonas do que noutras. Neste caso observou-se uma evaporação do solvente primeiramente nas extremidades da amostra, tendo evaporado posteriormente na zona central.

Para uma melhor perceção e visualização da topografia dos filmes de colagénios, recorreu-se à representação em 3D ilustrada na imagem c) da figura 31, referente a uma das áreas de varrimento efetuadas numa das amostras.

A topografia rugosa da amostra tem um papel importante para os ensaios celulares, dado que as células geralmente adaptam o seu movimento, orientação e adesão de acordo com a topologia do substrato [150]. Segundo U. Meyer *et al.*, [150] é conhecido desde 1930 o efeito da forma do substrato na morfologia, adesão e migração celulares.

Alguns autores defendem a existência de gamas de rugosidades sobre as quais as células maximizam a sua atividade funcional [149]. Diversos estudos apontam para uma boa diferenciação celular em superfícies com micro-rugosidades, para células com dimensões maiores, tais como os osteoblastos. Por exemplo, o estudo realizado por Sammons *et al.*, [151] demonstrou que as superfícies microporosas de implantes dentários de titânio aumentam o espalhamento das células osteoblásticas de ratos. Sabe-se também que relativamente à linha celular MG-63 a rugosidade da superfície influencia positivamente o potencial de proliferação e diferenciação das mesmas, afetando, no entanto negativamente a adesão, pelo que esta se apresenta reduzida para substratos demasiadamente rugosos [152].

4.4. Molhabilidade dos filmes de colagénio

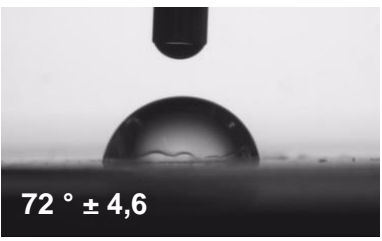
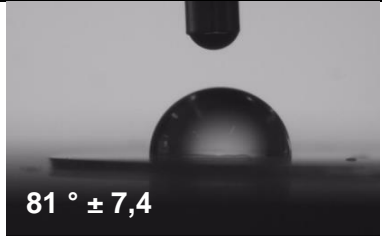


Outro parâmetro fundamental no estudo da superfície de biomateriais é a sua molhabilidade, ou seja, a hidrofiliicidade/ hidrofobicidade da superfície, uma vez que esta influencia o processo de adsorção de proteínas, que por sua vez afeta a adesão, proliferação e morfologia celulares [14, 153].

Neste estudo foram analisados filmes de colagénio que foram submetidos a uma polarização, para perceber se a carga induzida afeta o grau de hidrofiliicidade/hidrofobicidade do material, de forma a permitir a preparação de biomateriais modificados que permitam intervir ativamente na reparação/ regeneração de um tecido ou órgão. Os filmes de colagénio analisados foram preparados pelo método de *drop-casting*, tendo posteriormente sido polarizado dois grupos de filmes (filmes de colagénio (-) e filmes de colagénio (+)), para poder ser analisada a influência que as cargas induzidas nos filmes têm na molhabilidade dos mesmos.

Os resultados das medidas dos ângulos de contacto para os diversos grupos de filmes de colagénio encontram-se representados na tabela 4.

Dado que a rugosidade de uma determinada superfície é um factor que influencia a molhabilidade do material é de referir que os desvios padrões elevados, registados para os ângulos de contacto medidos podem estar relacionados com as rugosidades elevadas encontradas nas amostras, quantificada pela microscopia de força atómica.

Tabela 4- Ângulos de contacto obtidos para os diversos grupos de filmes analisados. Estas imagens foram adquiridas através de um sistema vídeo, do programa *uEye*, tendo sido em cada caso seleccionada a *frame* que correspondia à primeira que gota se encontrava estabilizada.

Medidas de ângulos de contacto		
Filmes	Ângulo de contacto médio	
Filmes de colagénio como processados	 72 ° ± 4,6	Filmes que não foram submetidos à polarização
Filmes de colagénio não polarizados	 81 ° ± 7,4	
Filmes de colagénio (-)	 51 ° ± 5,2	Filmes submetidos à polarização
Filmes de colagénio (+)	 49 ° ± 6,0	

É reportado na literatura que, quando o ângulo de contacto entre uma superfície e um líquido é superior a 90 °, a superfície em questão é considerada hidrofóbica, dado que a mesma não se apresenta favorável à molhabilidade. Nestes casos, o líquido tenta minimizar o contacto com a superfície, formando uma gota compacta, originando, deste modo, valores mais elevados para os ângulos de contacto no caso das superfícies referidas anteriormente [127].

Se, pelo contrário, os ângulos de contactos forem inferiores a 90 ° as superfícies são designadas de hidrofílicas. Estas, contrariamente às hidrofóbicas, apresentam-se favoráveis à molhabilidade, pelo que o líquido se espalha com maior facilidade sobre as mesmas, originando, assim, ângulos de contacto menores [127].

Os valores na tabela 4 indicam que todos os grupos de filmes de colagénio estudados apresentam ângulos de contacto inferiores a 90° , sendo estes considerados hidrofílicos. Estes resultados estão de acordo com os reportados na literatura, uma vez que o colagénio é considerado de natureza hidrofílica, estando esta associada à polaridade da proteína [150, 154].

O ângulo de contacto de $72^\circ \pm 4,6$ obtido neste trabalho, para os filmes de colagénio como processados, também foi observado por S. Ber *et al.*, [154] que realizaram estudos com filmes de colagénio quimicamente modificados com reagentes como o gluteraldeído e filmes sem qualquer tipo de tratamento.

Apesar de todas as amostras em estudo neste trabalho se encontrarem no domínio hidrofílico é de notar uma melhoria na hidrofilicidade dos filmes submetidos à polarização. Regista-se uma redução dos ângulos de contacto para o caso dos filmes de colagénio (-) e (+) obtendo-se um valor médio de $51^\circ \pm 5,2$ e $49^\circ \pm 6,0$ respetivamente. Ou seja, as cargas de superfície dos filmes polarizados facilitam a interação com as moléculas polares da água. Segundo U. Meyer *et al.*, [150] geralmente espera-se que os materiais que apresentem cargas superficiais positivas e negativas sejam mais hidrofílicos. Estudos acerca da molhabilidade realizados da hidroxiapatite em superfícies polarizadas e não polarizadas [155, 156] apresentam resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho para o colagénio, registando-se uma melhoria da molhabilidade para as amostras que foram submetidas à polarização.

Para além de Nakamura e Yamashita terem observado nos seus estudos [155, 157] uma melhoria da molhabilidade nas superfícies carregadas positiva e negativamente de hidroxiapatite, os autores também registaram as vantagens do efeito das cargas na atividade celular, tendo sido mais evidente no processo de adesão dos osteoblastos.

Segundo Bonakdar *et al.*, [158] geralmente as superfícies hidrofílicas são consideradas mais propícias para a adesão das células. Contudo é de notar que a adesão é favorecida dentro de uma determinada gama de hidrofilicidade, pelo que, as superfícies altamente hidrofílicas não são obrigatoriamente as mais favoráveis à adsorção proteica e adesão celular. Tal, é confirmado através de dados existentes na literatura acerca de adsorções proteicas desfavoráveis e elevadas tendências de desprendimentos celulares osteoblásticos MG-63 perante superfícies de diamante nanocristalino com terminações de oxigénio que apresentam ângulos de contacto entre os 20° e os 35°C [127, 149, 159, 160].

Existem outros factores que influenciam o processo de adesão. Sabe-se, por exemplo que segundos após o contacto da superfície com o meio de cultura, esta fica coberta por uma camada de proteínas e água, formando assim uma camada adsorvida onde

as células se ligarão com recetores que têm à sua superfície [152]. Como a superfície apresenta zonas diferentes que contribuem com potenciais áreas de energias de ligação diversas, como por exemplo zonas hidrofóbicas dispersas, dipolos permanentes, grupos carregados, etc., a interação das proteínas com a superfície será realizada de forma aleatória, dado que existem locais com orientações diferentes para a ligação das mesmas [126].

No caso por exemplo da fibronectina, que se trata de uma proteína que está envolvida em diversos processos, nomeadamente na adesão celular, a exposição dos locais onde a célula se liga à mesma é influenciada pelas propriedades superficiais, tais como a hidrofiliicidade e a carga. A fibronectina é constituída por módulos diferentes que por sua vez apresentam domínios carregados positiva e negativamente. Esta constituição acaba por levar a que na mesma proteína existam afinidades diferentes relativamente ao substrato, por exemplo polarizado positiva e negativamente, tendo influência na sua conformação e orientação perante a superfície em questão [161, 162].

É também de esperar que a própria natureza das cargas (positivas ou negativas) influencie a adesão das proteínas à superfície, dado que alguns domínios proteicos terão mais afinidade para cargas positivas, enquanto que, outros terão mais afinidade para cargas negativas. Este processo leva a que as proteínas apresentem orientações e conformações diferentes perante a superfície em questão, que acabam por se refletir na adesão celular.

Além do mecanismo de adesão celular depender do tipo de substrato em questão [163] também é fundamental ter em atenção o fenótipo e a origem da linha celular que se encontra em estudo, dado que as células não apresentam as mesmas respostas perante superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas [153].

Como se pode verificar existem diversos factores envolvidos na adsorção proteica e, conseqüentemente na adesão celular, pelo que o aumento da hidrofiliicidade introduzida pelas cargas, não implica necessariamente uma melhor resposta celular.

4.5. Caracterização estrutural dos filmes de colagénio por espectroscopia de refletância total atenuada do infravermelho com transformada de Fourier

O ATR-FTIR foi realizado com o objetivo de perceber se existem diferenças estruturais induzidas nos filmes de colagénio através do efeito da polarização. Para tal, foi analisado o seguinte conjunto de amostras: filmes de colagénio como processados, filmes não polarizados, filmes de colagénio (+) e filmes de colagénio (-). Os espectros obtidos para os diversos grupos representados na figura 32.

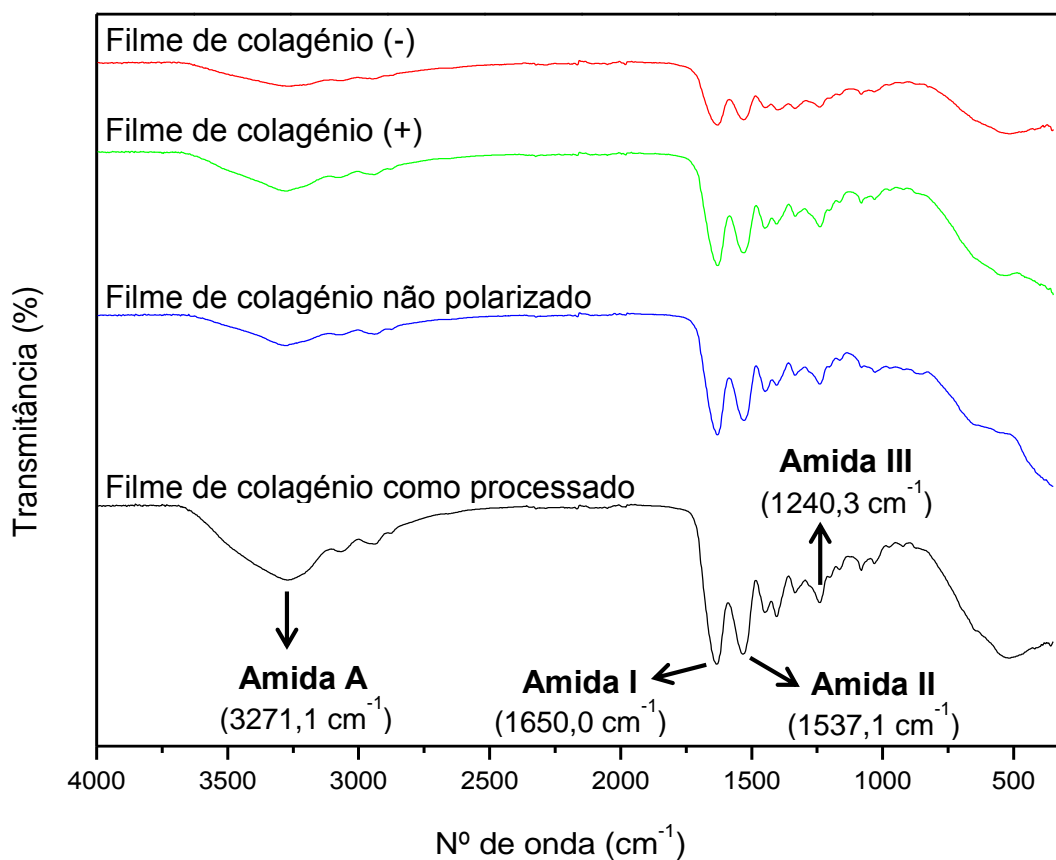


Figura 32- Espectros de infravermelhos dos diversos grupos de filmes analisados, onde é visível a presença das bandas de vibração da amida A ($3271,1 \text{ cm}^{-1}$), da amida I ($1650,0 \text{ cm}^{-1}$), da amida II ($1537,1 \text{ cm}^{-1}$) e por fim da amida III ($1240,3 \text{ cm}^{-1}$), que são típicas do colagénio, não tendo sido registadas alterações significativas.

Os espectros da figura 32 revelam, para todas as amostras analisadas, a presença das bandas típicas associadas à vibração das ligações existentes no colagénio, não se tendo registado diferenças significativas entre os grupos de filmes.

Geralmente as bandas de vibrações mais frequentemente encontradas para o colagénio são as bandas de amida I, II e III, que estão associadas às ligações amida que estabelecem a ligação entre os aminoácidos das cadeias polipeptídicas [164, 165].

Na Tabela 5 estão resumidamente apresentadas as vibrações e as frequências correspondentes, bem como a ligação e o modo de vibração maioritariamente encontrados no colagénio. Não existe um consenso na literatura relativamente às frequências de vibração representativas das amidas do colagénio, como se mostra na tabela 5.

Tabela 5- Vibrações e as frequências correspondentes, bem como a ligação e o modo de vibração maioritariamente encontrados no colagénio.

Frequências de vibração (cm ⁻¹)	Ligações e modos de vibração	Grupo	Referência
3310-3270	N-H (estiramento)	Amida A	[128]
1700-1600	C=O (estiramento)	Amida I	[164, 166]
1560	N-H (Torção) e C-N (estiramento)	Amida II	[164, 167]
1200-1300	C-N (estiramento) e C-C (estiramento) e N-H (torção)	Amida III	[167, 168]

Das bandas de vibração acima representadas, as que se destacam mais no caso das proteínas, incluindo o colagénio são a da amida I e II, uma vez que se trata da região do espectro mais sensível e que permite informações relevantes sobre a estrutura da proteína analisada [164]. Tal deve-se ao facto de a ligação C=O estar envolvida nas pontes de hidrogénio que se estabelecem entre os diversos elementos da estrutura secundária das proteínas [165].

Na figura 33 encontram-se representados de uma forma esquemática as vibrações que ocorrem nos dois grupos principais de amida.

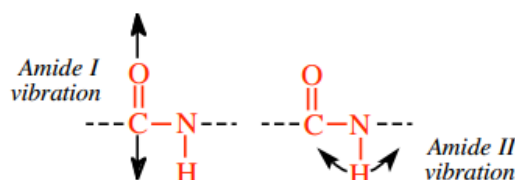


Figura 33- Modos de vibração das bandas de amida I: estiramento da ligação C=O e da amida II: torção da ligação N-H. [adaptado de [165]]

Para se conseguir detetar eventuais diferenças estruturais, provocadas pelas cargas induzidas nas amostras, seria necessário que houvesse alguma modificação relativamente à frequência correspondente às bandas de vibração nomeadamente deslocamento da banda de amida I para frequências mais baixas ou mais elevadas relativamente à frequência inicial. Deslocamentos das bandas para frequências mais baixas indicam geralmente uma diminuição da organização estrutural da proteína [96, 166], que poderá estar associada à quebra das ligações de hidrogénio [96]. Para o caso do colagénio quando são detetadas estas diferenças estruturais nos espetros pode ser uma eventual indicação do início do processo de desnaturação. Nos espetros obtidos neste trabalho a banda correspondente à amida I é mantida para todos os filmes e para o caso do colagénio (+) e (-), comparando com os filmes como processados e não polarizados, não se registam deslocamentos. Assim, é provável que a carga induzida não tenha levado a alterações significativas nas ligações atómicas de forma a provocar uma modificação/ destruição estrutural do colagénio.

4.6. Ensaio celulares

Após as caracterizações realizadas aos filmes finos de colagénio relativamente à sua morfologia e composição, procedeu-se então à avaliação dos mesmos em ambiente biológico. As células utilizadas foram: células osteoblásticas humanas (hOB) e uma linha tumoral (MG-63)

Neste estudo foram utilizados os seguintes grupos de amostras: filmes de colagénio como processados; filmes não polarizados e filmes de colagénio (+) e (-), com o objetivo de perceber eventuais diferenças relativamente à morfologia e adesão celular nos diversos grupos utilizados.

Assim, os grupos definidos como controlos foram: o vidro, o plástico (poliestireno), os filmes de colagénio e os filmes não polarizados.

4.6.1. Estudos de morfologia e adesão celular nos filmes de colagénio polarizados

A adesão celular é um fenómeno que está envolvido numa série de fenómenos naturais, tais como a manutenção na estrutura dos tecidos, nas respostas imunológicas, bem como na integração de um biomaterial no meio biológico [169].

Este processo envolve a intervenção de diversas moléculas biológicas, tais como proteínas da matriz extracelular, da membrana celular e do citoesqueleto. A adesão celular, no caso dos osteoblastos, tem um papel crucial na regulação do subsequente processo de proliferação, diferenciação e migração celular [163]. Desta forma, pretendeu-se compreender o efeito dos filmes de colagénio polarizados na morfologia e adesão celular.

Nas figuras 34 e 35 que se seguem, estão representadas as morfologias das células hOB e MG-63, respetivamente, nas diversas superfícies analisadas após 24 h.

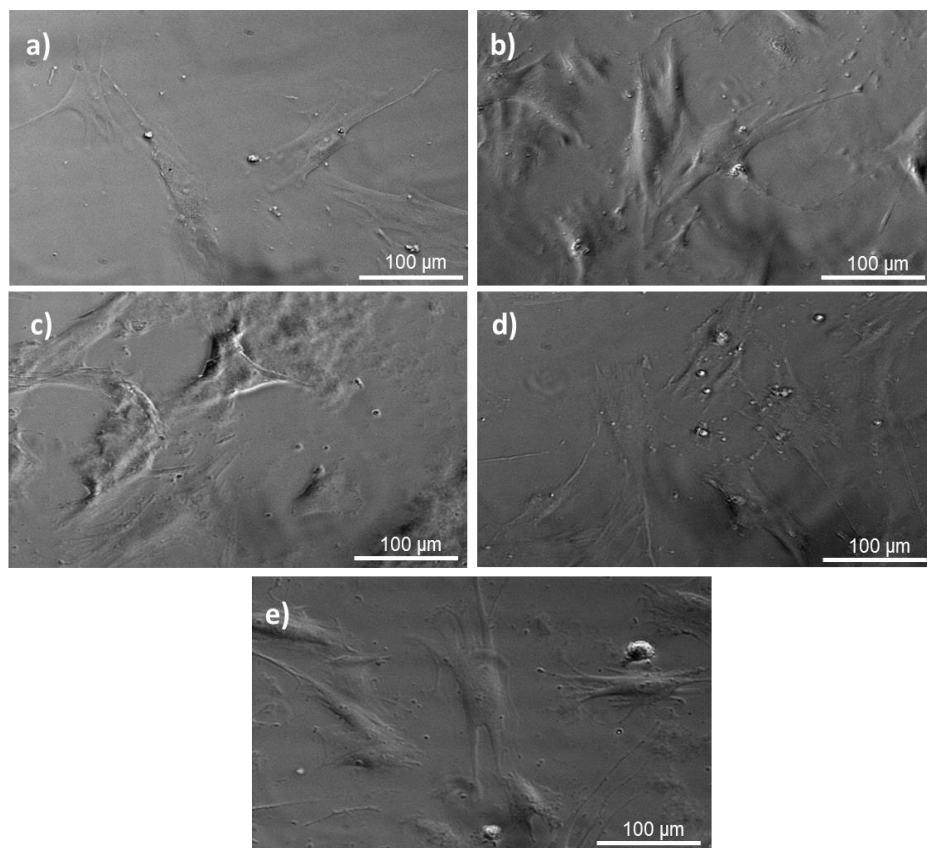


Figura 34- Imagens das células hOB aderidas a diferentes superfícies: a) lamela de vidro; b) filme de colagénio como processado; c) filme de colagénio não polarizado; d) filme de colagénio (+) e por fim e) filme de colagénio (-) obtidas por microscopia de contraste de fase.

Segundo Mansur *et al.*, [170] o espalhamento celular pode ser classificado nas seguintes categorias: as células parcialmente distribuídas, em que as mesmas apresentam ainda algumas divergências relativamente às extensões das membranas plasmáticas, estando no processo em que se começam a espalhar de forma lenta; as não espalhadas, que normalmente não apresentam extensões da membrana, estando associadas a uma forma celular esférica e, por fim as totalmente espalhadas, que corresponde normalmente à categoria em que as células apresentam uma atividade celular melhorada.

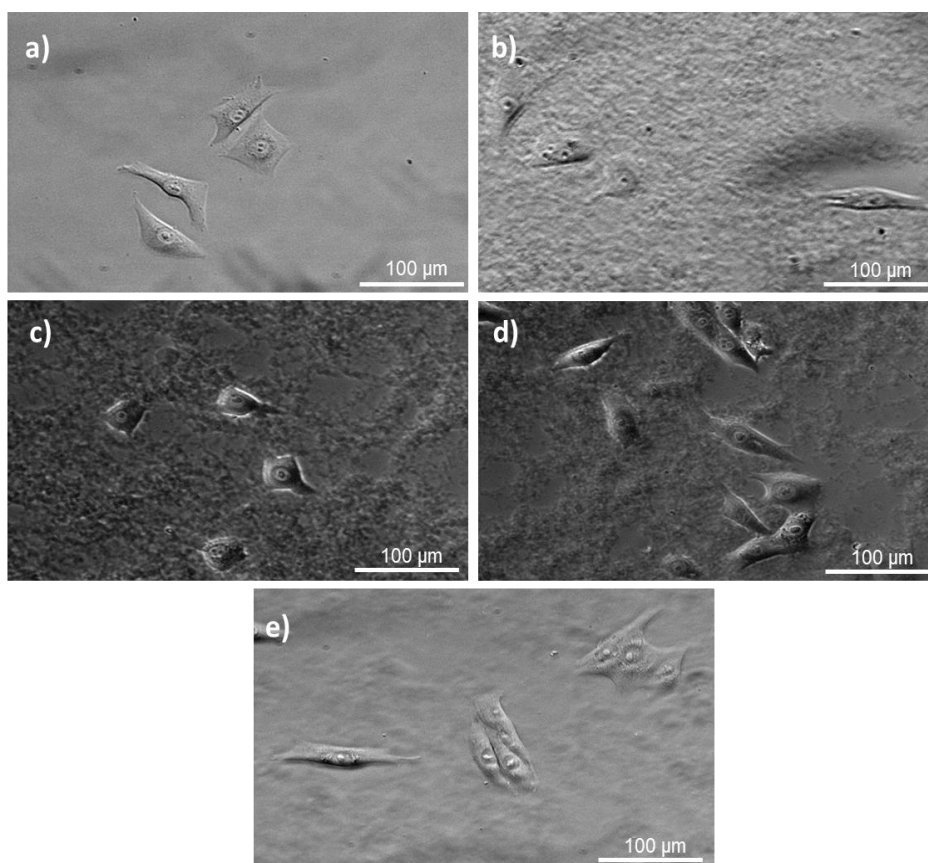
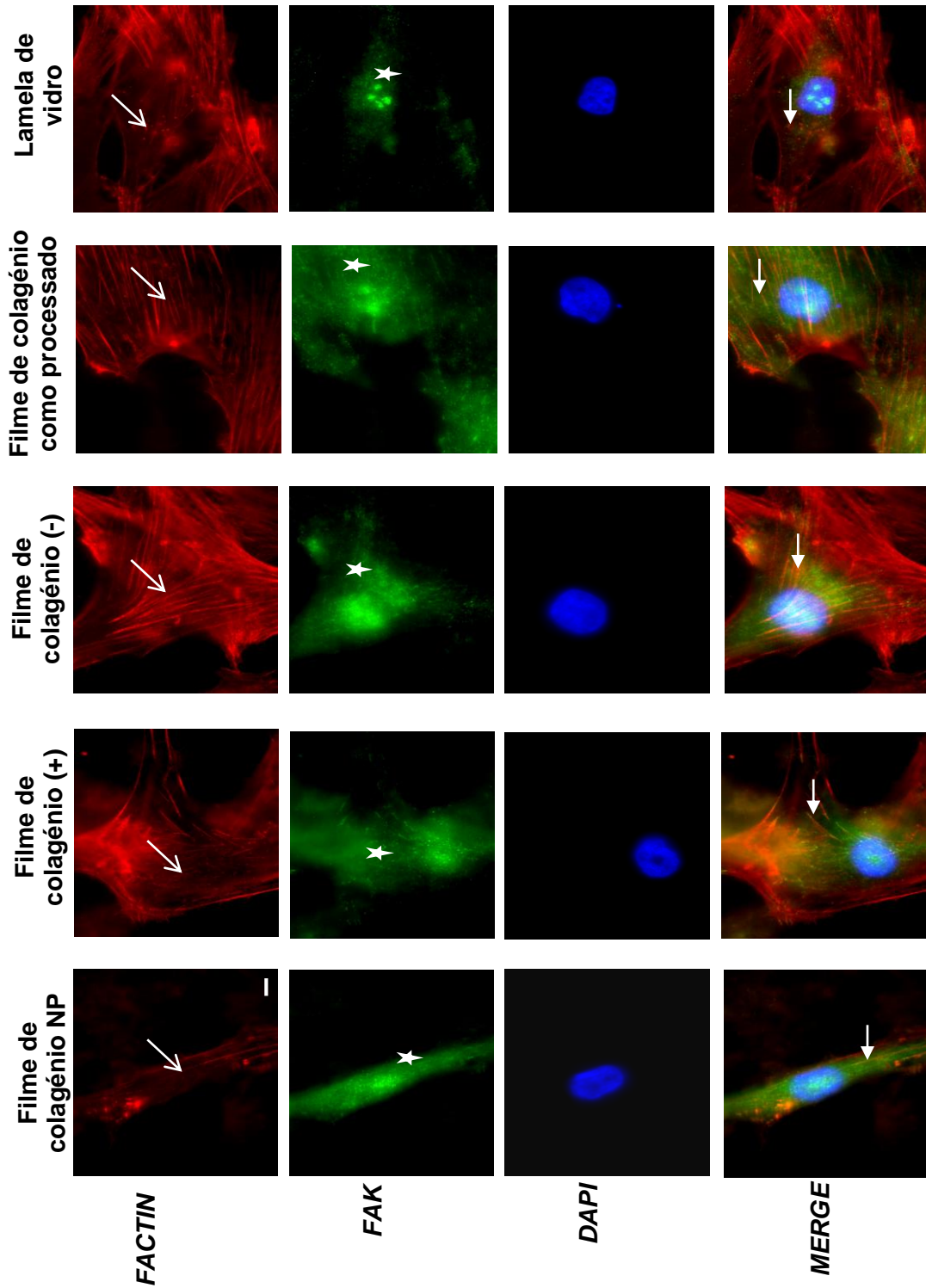


Figura 35- Imagens das células MG-63 aderidas a diferentes superfícies: a) lamela de vidro; b) filme de colagénio como processado; c) filme de colagénio não polarizado; d) filme de colagénio (+) e por fim e) filme de colagénio (-) obtidas por microscopia de contraste de fase.

Nas figuras 36 e 37 encontram-se representadas imagens celulares das hOB e das MG-63 respetivamente, obtidas através do microscópio Olympus IX-81 nas diferentes superfícies, permitindo visualizar a presença de filamentos de F-actina e os locais de adesão, bem como as diferenças morfológicas existentes entre as células aderidas aos diversos substratos.



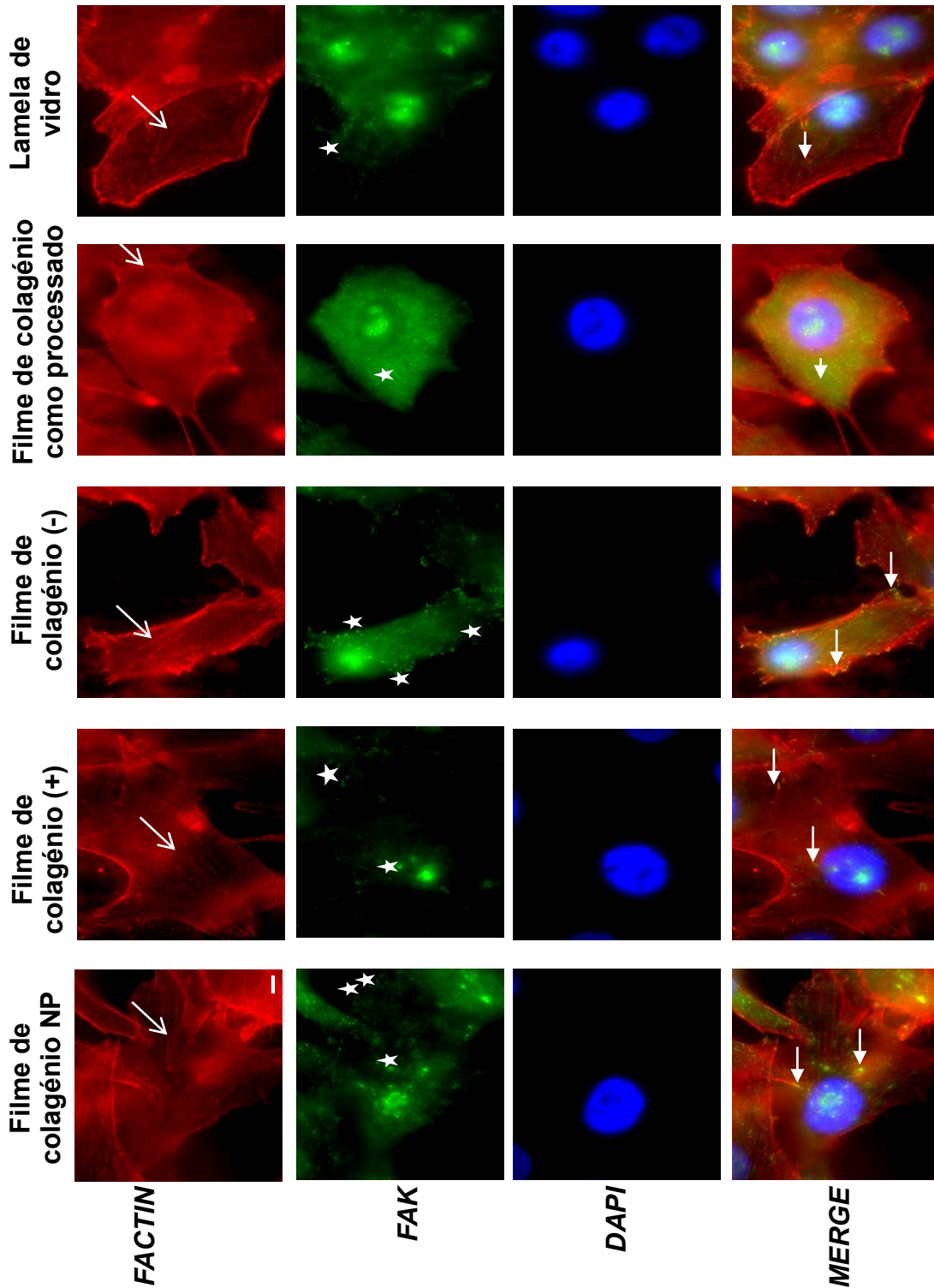
↙ Filamentos de F-actina ★ Locais de adesão ← Colocalização das fibras dos filamentos de F-actina e dos locais de adesão

Figura 36- Imagens das células hOB aderidas nas diferentes superfícies, após 4 dias. Os osteoblastos dispõem da formação de filamentos de F-actina (marcação de actina com rodamina-faloidina a vermelho), também é possível observar a adesão focal (marcação indirecta com anti-FAK conjugado com Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG anticorpo a verde), marcação de núcleos com DAPI (azul) e a sobreposição das marcações. Ampliação = 1000 x. A escala na imagem representa 5 µm.

Nakamura *et al.*, [157] verificaram que as células em contacto com as superfícies de hidroxiapatite não polarizadas apresentavam formas arredondadas ou esféricas, enquanto que as células nas superfícies polarizadas positiva e negativamente apresentavam formas fusiformes. No presente trabalho, as células nas superfícies não polarizadas não se apresentam propriamente com uma forma arredondada, ostentando no entanto, tal como verificado por Nakamura *et al.*, [157] para os substratos polarizados ter mais extensões das membranas citoplasmáticas, o que leva a concluir que as células estejam num processo de adesão. O facto de as células hOB nas superfícies dos filmes polarizados apresentarem uma maior expansão do que nos filmes não polarizados pode ser uma indicação de que a célula tem uma clara preferência por este tipo de superfície.

Pela figura 36 é possível verificar a presença dos filamentos de F-actina, bem como uma maior orientação das mesmas nas amostras polarizadas, o que é uma indicação da existência de uma forte interação das células com as superfícies polarizadas. Geralmente uma característica fenotípica típica de uma célula que se encontra em adesão é a formação de estruturas filamentosas de actina bem orientadas. Assim é de esperar que haja uma melhor adesão por parte da célula a esse tipo de substrato quando comparado às superfícies que não foram submetidas à polarização.

Tal como aqui observado, Nakamura *et al.*, [163] registaram a formação de mais filamentos de F-actina nas superfícies polarizadas, indicando um maior grau de espalhamento celular nas superfícies de hidroxiapatite polarizadas positiva e negativamente.



↙ Filamentos de F-actina ★ Locais de adesão ← Colocalização dos filamentos de F-actina e dos locais de adesão

Figura 37- Imagens das células MG-63 aderidas nas diferentes superfícies, após 4 dias. Os osteoblastos dispõem da formação de filamentos de F-actina (marcação de actina com rodamina-faloidina a vermelho), também é possível observar a adesão focal (marcação indirecta com anti-FAK conjugado com Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG anticorpo a verde), marcação de núcleos com DAPI (azul) e a sobreposição das marcações. Ampliação = 1000 x. A escala na imagem representa 5 μ m.

Analisando a figura 37 torna-se visível que, tal como constatado para as células hOB, existe uma maior presença e orientação de fibras de actina nas células MG-63 aderidas às superfícies polarizadas, apontando assim para uma eventual preferência celular por este tipo de substrato.

Fazendo uma análise comparativa das células aderidas aos filmes de colagénio (-) e (+), verifica-se que a célula em contacto com o substrato carregado negativamente apresenta uma menor área de expansão, podendo ser um indício de que a célula se encontra num processo de migração celular. Esta ideia é reforçada pelo facto de a célula no filme de colagénio (-) apresentar pequenas protusões na zona superior, existindo fibras de actina nas zonas limiares da mesma. Geralmente para que ocorra o fenómeno de migração celular é necessário que haja uma interação dinâmica entre a célula e o substrato, sendo este processo caracterizado pela formação de extensões na direção de migração e pela retração do citoesqueleto celular, levando à formação das fibras de actina maioritariamente na zona mais periférica da célula [169, 171, 172].

Para confirmar se existem diferenças relativamente à adesão celular foi realizada a contagem das mesmas, encontram-se representados na figura 38 os resultados obtidos relativamente à contagem celular das hOB, permitindo analisar o número de células aderidas às diferentes superfícies.

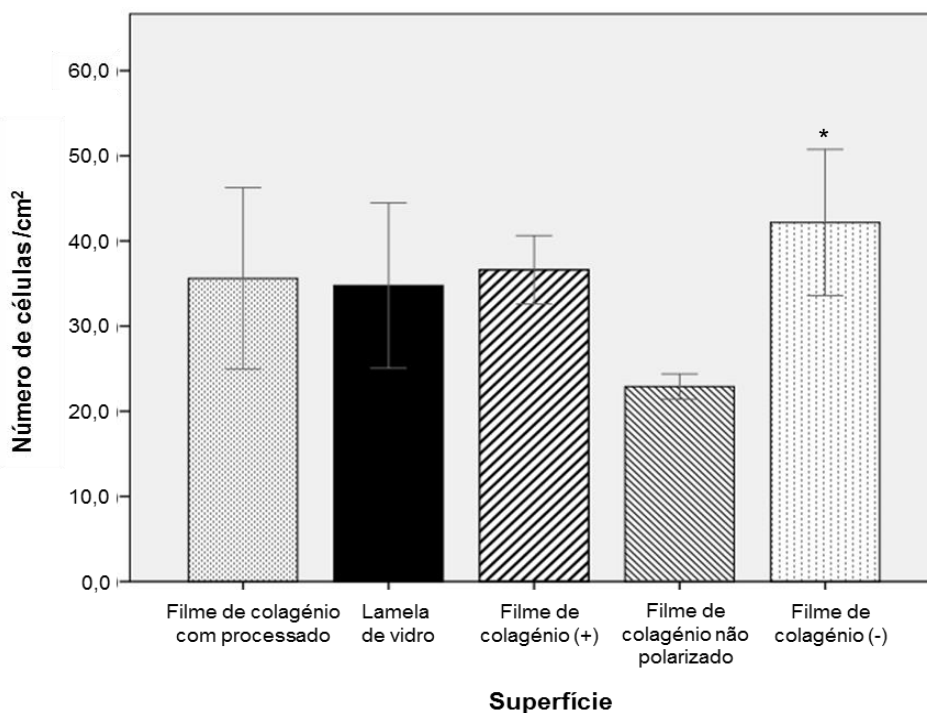


Figura 38- Teste de multicomparações de Tukey (ANOVA) entre as diferentes superfícies analisadas nas quais as células hOB aderiram. *Diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$), entre as superfícies dos filmes de colagénio não polarizados e as superfícies dos filmes de colagénio (-), com $p = 0.03$. Esta análise foi realizada pelo SPSS v.21.

Neste caso, verifica-se um maior número de células aderidas à superfície dos filmes de colagénio (-), o que está de acordo com alguns estudos realizados acerca de hidroxiapatite polarizada que se encontram reportados na literatura [173].

Sabe-se que geralmente os osteoblastos são influenciados positivamente pelas propriedades de superfícies carregadas aumentando a sua atividade nesse tipo de substratos [150]. Contudo, os mecanismos envolvidos neste processo não são ainda totalmente compreendidos, não existindo deste modo um consenso na literatura acerca da preferência das células por superfícies carregadas positiva ou negativamente, nem dos fenómenos físicos que lhes estão subjacentes. Assim, há estudos que apontam para uma maior adesão e atividade celular dos osteoblastos em superfícies carregadas negativamente [57, 173, 174] enquanto outros estudos referem uma maior atividade celular em superfícies positivas [149, 175, 176].

Contrariamente ao que foi observado para as células hOB, não se registaram diferenças significativas na adesão das MG-63 para nenhum dos grupos de filmes em estudo, como é possível observar através da figura 39.

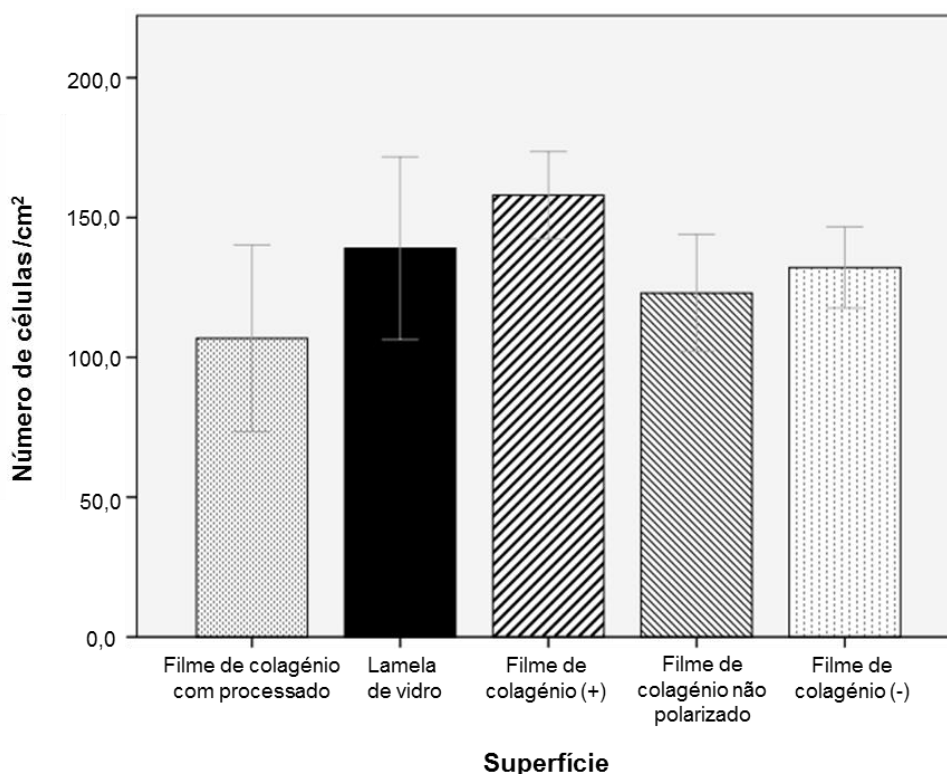


Figura 39- Teste de multicomparações de Tukey (ANOVA) entre as diferentes superfícies analisadas nas quais as células MG-63 aderiram. Considerando-se significativos os resultados com $p \leq 0,05$. Neste caso o valor mais baixo obtido foi $p=0,089$ entre as superfícies dos filmes de colagénio como processados e dos filmes de colagénio (+), não se tendo registado deste modo diferenças significativas. Esta análise foi realizada pelo SPSS v.21.

A inexistência de diferenças significativas para o caso das MG-63 relativamente às amostras polarizadas e não polarizadas, pode estar relacionado com o facto de se tratar de uma linha celular cancerígena que secreta proteínas da matriz extracelular em elevadas proporções. Assim a superfície das amostras acaba por ser completamente coberta por um emaranhado de proteínas e de células, dado que as linhas celulares cancerígenas também se proliferam e diferenciam mais rapidamente do que as normais, conduzindo a que o efeito da carga na atividade celular seja atenuado.

Nas figuras que se seguem estão representadas micrografias fluorescentes dos núcleos das células hOB e MG-63, a partir das quais foram realizadas as contagens celulares. Através destas imagens é visível um maior número celular em todas as superfícies para a linha celular MG-63.

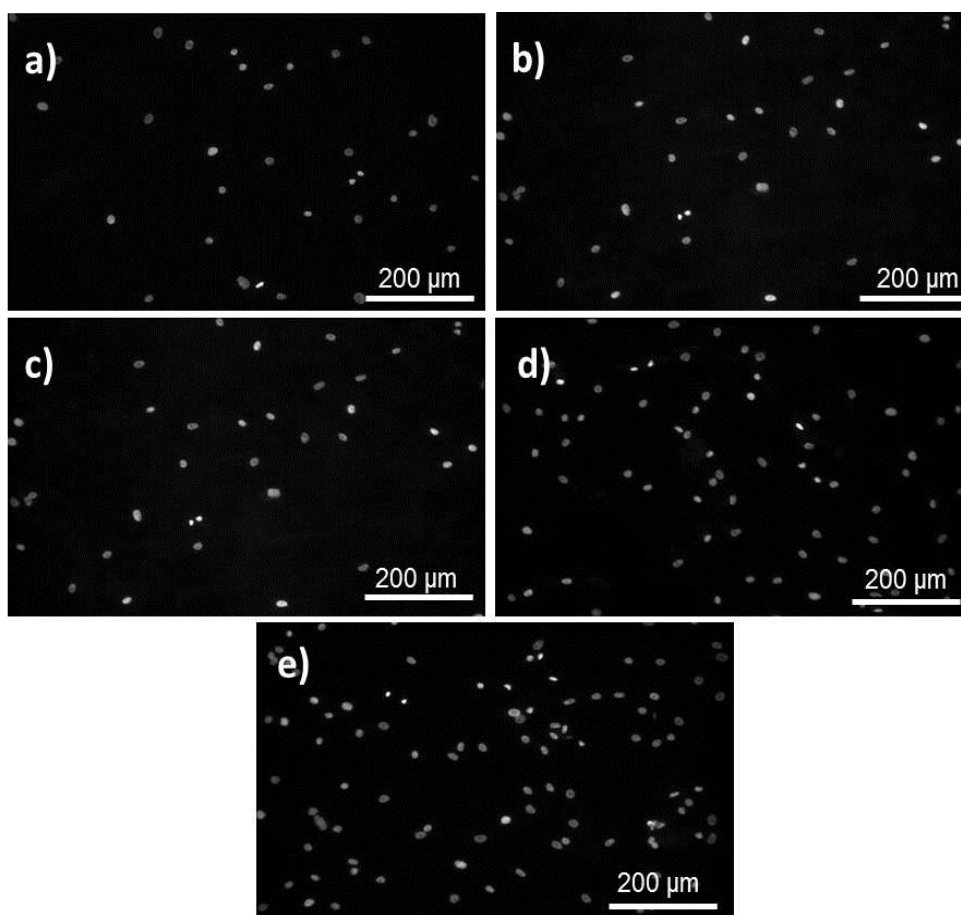


Figura 40- Micrografias fluorescentes dos núcleos das células hOB que aderiram aos filmes de colagénio: a) lamela de vidro ; b) filme de colagénio como processado; c) filme de colagénio não polarizado; d) filme de colagénio (+) e por fim e) filme de colagénio (-).

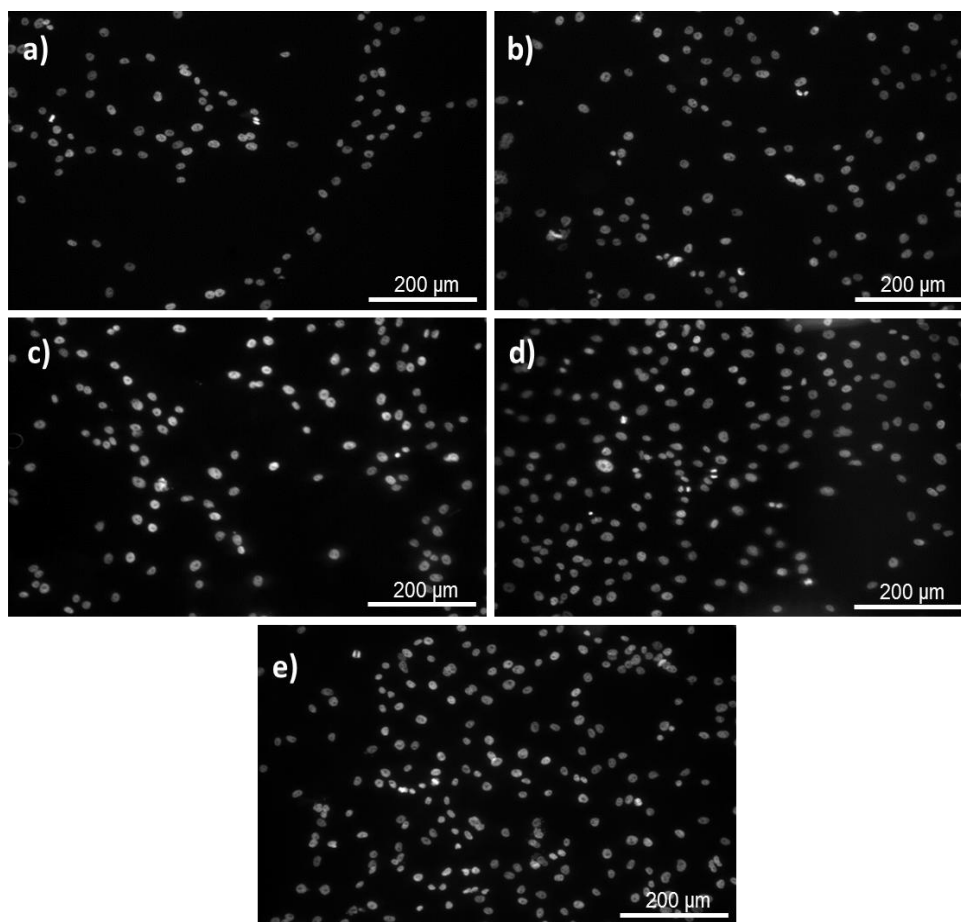


Figura 41- Micrografias fluorescentes das células MG-63 que aderiram aos filmes de colagénio : a) lamela de vidro; b) filme de colagénio como processado; c) filme de colagénio não polarizado; d) filme de colagénio (+) e por fim e) filme de colagénio (-).

Pelos gráficos das contagens (Figuras 38 e 39) e através das imagens representadas acima (Figuras 40 e 41), torna-se evidente que existem respostas diferentes perante os mesmos substratos para as células hOB e MG-63. Verificou-se que um maior número de células MG-63 aderiram às superfícies estudadas comparativamente às células hOB, assim como comportamentos morfológicos ligeiramente distintos. A obtenção de resultados diferentes para os dois tipos de células em estudo pode dever-se ao facto de a resposta/ expressão celular diferir mediante o tipo de células e o substrato [152]. Desta forma como as células se apresentam fenotipicamente diferentes é naturalmente de esperar que tanto a nível morfológico, bem como a nível de adesão celular sejam obtidos resultados diferentes.

Apesar das diferentes respostas celulares, verificou-se neste trabalho que a polarização dos filmes de colagénio tem influência na atividade celular.

Capítulo 5

Conclusões e trabalhos futuros

5. Conclusões e trabalhos futuros

5.1. Conclusões

Através da realização do presente trabalho foi possível preparar filmes de colagénio tipo I para aplicações na área da engenharia de tecidos, mais especificamente na regeneração óssea, com o principal objetivo de verificar qual a influência que a polarização, ou seja a indução de cargas nos filmes de colagénio tem na adesão e morfologia celular.

Para a realização deste estudo foram necessárias contemplar as seguintes etapas: 1) preparação dos filmes de colagénio e sua caracterização em termos de morfologia, estrutura, rugosidade e comportamento térmico; 2) polarização das amostras procedendo ao estudo de eventuais diferenças na molhabilidade e ligações químicas dos filmes de colagénio submetidos à polarização e por fim 3) avaliação da resposta celular nas amostras polarizadas e não polarizadas, relativamente à sua morfologia e adesão celular.

Os filmes de colagénio obtidos apresentam uma espessura de aproximadamente 2 μm , exibindo uma superfície relativamente homogénea, não se tendo observado a típica estrutura fibrilar normalmente encontrada para o colagénio tipo I. Os filmes obtidos apresentam irregularidades micrométricas superficiais, quantificadas por uma rugosidade média de $111 \pm 20 \text{ nm}$.

As medidas de ângulo de contacto revelaram que as superfícies dos filmes de colagénio submetidos à polarização apresentam melhorias na molhabilidade, sendo estes mais hidrofílicos do que o grupo de filmes que não foram submetidos à polarização.

Os espetros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) apresentaram as bandas típicas do colagénio tipo I, tendo sido detetada a amida A, I, II e III, para todos os grupos de filmes de colagénio e não havendo a registar diferenças significativas nas frequências de vibrações para os grupos identificados.

Os ensaios celulares evidenciaram diferenças morfológicas e de adesão nas superfícies polarizadas comparativamente com as não polarizadas. Desta forma, verificou-se um aumento dos filamentos de F-actina e uma maior orientação desses mesmos filamentos nas superfícies polarizadas comparativamente com as células nas superfícies não polarizadas. Relativamente à adesão celular verificou-se que as células hOB aderiram maioritariamente às superfícies carregadas negativamente, o

que está de acordo com estudos realizados anteriormente por diversos autores em superfícies polarizadas de hidroxiapatite [173, 174].

No que se refere à resposta celular das MG-63, apesar da análise quantitativa mostrar que não existem diferenças significativas em termos de viabilidade celular, a análise da morfologia para tempos de cultura curtos evidencia um efeito da carga na morfologia celular.

Através da existência de filamentos de F-actina orientadas nas células aderidas aos substratos polarizados e considerando os resultados obtidos para a contagem celular das hOB, pode concluir-se que a polarização induz de facto diferenças no comportamento celular, sendo no entanto necessário ter em conta o tipo de células e o substrato em estudo.

5.2. Trabalhos futuros

Ao longo deste trabalho foram obtidos resultados inovadores que mostram claramente que há uma dependência da interação celular com a polarização da superfície; resultados estes com relevância e que permitem antever a possibilidade de aplicação de filmes de colagénio polarizados como potencial plataforma para medicina regenerativa. Tratando-se de resultados iniciais, são necessários mais estudos, de forma a entender o fenómeno da adesão e modificações a nível celular que ocorrem através das cargas induzidas no material.

Para tal, sugere-se que o estudo prossiga nas seguintes vertentes:

- Preparação de filmes de colagénio, idealmente com uma espessura superior e sem substrato, a um pH superior, de forma a que seja induzido a formação de fibrilhas.
- Realização de ensaios microscopia eletrónica de transmissão (TEM) utilizando agentes de contraste, como o ácido fosfotúngstico, e de fixação hexametildisilazano, para conseguir obter imagens com maior resolução da estrutura e da superfície dos filmes de colagénio.
- Cálculo das energias superficiais dos filmes polarizados e não polarizados.

- Realização do *Circular Dichroism*, para análise de diferenças a nível da estrutura secundária do colagénio, entre os grupos não polarizado e os grupos polarizados.
- Preparação de fibras de colagénio através do *electrospinning*, procedendo-se à sua polarização.
- Usar a técnica do *Thermal Stimulated Discharge Current* (TSDC), para quantificar as cargas e analisar o seu decaimento (despolarização) ao longo do tempo.
- Continuação dos ensaios celulares, que permitam elucidar acerca da morfologia celular, nos diversos grupos em análise (filmes de colagénio, filmes não polarizados, filmes de colagénio (+) e (-)).

Capítulo 6

Referências bibliográficas

6. Referências bibliográficas

1. Martins, A., et al., *Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications*. Nanomedicine, 2007. **2**(6): p. 929-942.
2. Liu, X. and P. Ma, *Polymeric scaffolds for bone tissue engineering*. Annals of biomedical engineering, 2004. **32**(3): p. 477-486.
3. Furth, M.E., A. Atala, and M.E. Van Dyke, *Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine*. Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5068-5073.
4. Shastri, V.P. and A. Lendlein, *Materials in regenerative medicine*. Advanced materials, 2009. **21**(32-33): p. 3231-3234.
5. Salgado, A.J., O.P. Coutinho, and R.L. Reis, *Bone tissue engineering: state of the art and future trends*. Macromolecular bioscience, 2004. **4**(8): p. 743-765.
6. Yang, J., et al., *Cell sheet engineering: recreating tissues without biodegradable scaffolds*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6415-6422.
7. Barroca, N., et al., *Protein adsorption on piezoelectric poly(L-lactic) acid thin films by scanning probe microscopy*. Applied Physics Letters, 2011. **98**(13): p. -.
8. Minary-Jolandan, M. and M.-F. Yu, *Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: polarization and piezoelectricity*. Nanotechnology, 2009. **20**(8): p. 085706.
9. Fukada, E. and I. Yasuda, *On the piezoelectric effect of bone*. J. Phys. Soc. Japan, 1957. **12**(10): p. 1158-1162.
10. Yasuda, I., *Piezoelectric effects in collagen*. Japanese Journal of Applied Physics Vol, 1964. **3**(2).
11. Guo, H.-F., et al., *Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012. **96**: p. 29-36.
12. Lee, Y.-S., G. Collins, and T. Livingston Arinzeh, *Neurite extension of primary neurons on electrospun piezoelectric scaffolds*. Acta biomaterialia, 2011. **7**(11): p. 3877-3886.
13. Baxter F. R., et al., *Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses*. Annals of biomedical engineering, 2010. **38**(6): p. 2079-2092.
14. Barroca, N., et al., *Stability of electrically induced-polarization in poly (L-lactic) acid for bone regeneration*. Applied Physics Letters, 2012. **101**(2): p. -.
15. Ferreira A. M., et al. *Collagen Piezoelectric effect induce bone healing*. 2007. **Vol. 16**.
16. Ferreira, A.M., et al., *Collagen for bone tissue regeneration*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(9): p. 3191-3200.
17. Frias, C., et al., *Polymeric piezoelectric actuator substrate for osteoblast mechanical stimulation*. Journal of biomechanics, 2010. **43**(6): p. 1061-1066.
18. Wnek, G.E. and G.L. Bowlin, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. 2008: Informa Healthcare USA.
19. Lee, C.H., A. Singla, and Y. Lee, *Biomedical applications of collagen*. International journal of pharmaceutics, 2001. **221**(1): p. 1-22.

20. Ramadan, K.S., D. Sameoto, and S. Evoy, *A review of piezoelectric polymers as functional materials for electromechanical transducers*. Smart Materials and Structures, 2014. **23**(3): p. 033001.
21. Telega J.J, W.R., *Piezoelectric effects in biological tissues*. Journal of theoretical and applied mechanics -Warsaw-, (2002). **40**: p. 723-760.
22. Piccolino, M., *Luigi Galvani and animal electricity: two centuries after the foundation of electrophysiology*. Trends in neurosciences, 1997. **20**(10): p. 443-448.
23. Becker, R.O., *The bioelectric factors in amphibian-limb regeneration*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 1961. **43**(5): p. 643-656.
24. Lund, E.J., *Bioelectric fields and growth*. Soil Science, 1947. **64**(3): p. 253.
25. Burr, H.S. and F.S.C. Northrop, *The electro-dynamic theory of life*. The Quarterly Review of Biology, 1935. **10**(3): p. 322-333.
26. Marino, A.A., *Direct current and bone growth*. Modern Bioelectricity, Marcel Dekker, New York, NY, 1988: p. 657-709.
27. Marino A. A., Becker R. O., and S.S. C., *Origin of the piezoelectric effect in bone*. Calcified tissue research, 1971. **8**(1): p. 177-180.
28. Shamos M.H., L.L.S., *Piezoelectric effect in bone*. Nature, 1963. **197**: p. 81.
29. Yasuda, I., *On the piezoelectric activity of bone*. J Jpn Orthop Surg Soc, 1954. **28**: p. 267.
30. Junqueira, L.C., e Carneiro J., *Histologia Básica*. 10ªedição ed. 2004, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
31. Seeley, R.R., P. Tate, and T.D. Stephens, *Anatomy and Physiology*. 2008: McGraw-Hill Companies.
32. Duncan, R. and C. Turner, *Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain*. Calcified tissue international, 1995. **57**(5): p. 344-358.
33. Ruff, C., B. Holt, and E. Trinkaus, *Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation*. American Journal of Physical Anthropology, 2006. **129**(4): p. 484-498.
34. Lang, S.B., *Pyroelectric effect in bone and tendon*. 1966.
35. Athenstaedt, H., *Permanent longitudinal electric polarization and pyroelectric behaviour of collagenous structures and nervous tissue in man and other vertebrates*. Nature, 1970. **228**: p. 830-834.
36. Yasuda, I., K. Noguchi, T. Sata, *Dynamic callus and electrical callus*. J. Bone Joint Surg., 1955. **Vol 37A**: p. 1292-1293.
37. http://www.mhhe.com/biosci/ap/ap_casestudies/cases/answers/ap-answer_case06-07.html. [Consultado a 14/3/2014].
38. Garratt, A.C., *Electro-physiology and Electro-therapeutics*. 1860: Ticknor and Fields.
39. Halperin, C., et al., *Piezoelectric effect in human bones studied in nanometer scale*. Nano Letters, 2004. **4**(7): p. 1253-1256.
40. Lang, S.B., et al., *Pyroelectric, piezoelectric, and photoeffects in hydroxyapatite thin films on silicon*. Applied Physics Letters, 2011. **98**(12): p. -.

41. Gandhi, A.A., et al., *Piezoelectricity in Poled Hydroxyapatite Ceramics*. Journal of the American Ceramic Society, 2014. **97**(9): p. 2867-2872.
42. Chao, E. and N. Inoue, *Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling*. Eur Cell Mater, 2003. **6**: p. 72-84.
43. Schmidt, C.E. and J.B. Leach, *Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration*. Annual review of biomedical engineering, 2003. **5**(1): p. 293-347.
44. Tomofuji, T., et al., *Effects of electrical stimulation on periodontal tissue remodeling in rats*. Journal of periodontal research, 2013. **48**(2): p. 177-183.
45. Rouabhia, M., et al., *Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation*. Plos One, 2013. **8**(8).
46. Martinez-Rodriguez, A., et al., *The effect of alternating and biphasic currents on humans' wound healing: a literature review*. International Journal of Dermatology, 2013. **52**(9): p. 1053-1062.
47. Garcia S., Kunitz E., and S. K., *Piezoelectric effect and its applications*, 1998.
48. Heywang, W., K. Lubitz, and W. Wersing, *Piezoelectricity: Evolution and Future of a Technology*. Vol. 114. 2008: Springer.
49. Vilarinho, P., *Functional materials: Properties, processing and applications*, in *Scanning Probe Microscopy: Characterization, Nanofabrication and Device Application of Functional Materials*. 2005, Springer. p. 3-33.
50. Jordan T.L., O.Z., *Piezoelectric Ceramics Characterization* NASA/CR-2001-211225. **ICASE Report No. 2001-28**.
51. *Lecture 19 of Pittsburgh- Department of Mechanical Engineering* consultado em <http://www.pitt.edu/~qiw4/Academic/ME2080/Lecture19b.pdf>. [Consultado a 5/2/2014].
52. *Piezoelectric Constants* consultado em: <https://www.americanpiezo.com/knowledge-center/piezo-theory/piezoelectric-constants.html> [Consultado a 25/11/2014].
53. N., B., *Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea* in *Departamento de Cerâmica do vidro* 2008, Universidade de Aveiro.
54. Furuya, K., et al. *Acceleration of osteogenesis by using barium titanate piezoelectric ceramic as an implant material*. in *SPIE Smart Structures and Materials+ Nondestructive Evaluation and Health Monitoring*. 2011. International Society for Optics and Photonics.
55. Beloti M.M., et al., *In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly (vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **79**(2): p. 282-288.
56. Baxter, F.R., et al., *An in vitro study of electrically active hydroxyapatite-barium titanate ceramics using Saos-2 cells*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2009. **20**(8): p. 1697-1708.
57. Bodhak, S., S. Bose, and A. Bandyopadhyay, *Electrically polarized HAp-coated Ti: In vitro bone cell-material interactions*. Acta biomaterialia, 2010. **6**(2): p. 641-651.

58. Itoh, S., et al., *Enhanced bone ingrowth into hydroxyapatite with interconnected pores by Electrical Polarization*. *Biomaterials*, 2006. **27**(32): p. 5572-5579.
59. Wang, W., et al., *Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and poorly interconnected pores by electrical polarization*. *Acta biomaterialia*, 2009. **5**(8): p. 3132-3140.
60. Kawai, H., *The Piezoelectricity of Poly (vinylidene Fluoride)* *Japanese Journal of Applied Physics* 1969. **vol. 8**, (No. 7): p. 975-976.
61. Laroche, G., et al., *Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: from polymeric raw material to monofilament vascular suture*. *Journal of biomedical materials research*, 1995. **29**(12): p. 1525-1536.
62. Bormashenko, Y., et al., *Vibrational spectrum of PVDF and its interpretation*. *Polymer Testing*, 2004. **23**(7): p. 791-796.
63. Fine, E.G., et al., *Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride-trifluoroethylene copolymer guidance channels*. *Biomaterials*, 1991. **12**(8): p. 775-780.
64. Jiang, X., et al., *Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits*. *Experimental neurology*, 2010. **223**(1): p. 86-101.
65. Valentini, R.F., et al., *Patterned neuronal attachment and outgrowth on surface modified, electrically charged fluoropolymer substrates*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1994. **5**(1-2): p. 13-36.
66. Harrison, J. and Z. Ounaies, *Piezoelectric polymers*. NASA/CR-2001-211422. **ICASE Report No. 2001-43**.
67. Turner, J., et al., *Characterization of drawn and undrawn poly-L-lactide films by differential scanning calorimetry*. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 2004. **75**(1): p. 257-268.
68. Ochiai, T. and E. Fukada, *Electromechanical properties of poly-L-lactic acid*. *Japanese journal of applied physics*, 1998. **37**(part 1): p. 3374-3376.
69. Barroca, N., et al., *Poled piezoelectric PLLA platforms for neural tissue regeneration*. submetido a *Biomaterials* Outubro de 2014.
70. Silva, C.C., et al., *Piezoelectric properties of collagen-nanocrystalline hydroxyapatite composites*. *Journal of materials science*, 2002. **37**(10): p. 2061-2070.
71. Goes, J., et al., *Piezoelectricity of native and anionic collagen*. *Journal of materials science letters*, 1999. **18**(12): p. 983-986.
72. Fukada, E., H. Ueda, and R. Rinaldi, *Piezoelectric and related properties of hydrated collagen*. *Biophysical journal*, 1976. **16**(8): p. 911-918.
73. Netto, T.G. and R.L. Zimmerman, *Effect of water on piezoelectricity in bone and collagen*. *Biophysical journal*, 1975. **15**(6): p. 573-576.
74. Ferreira A.M., et al., *Bone collagen role in piezoelectric mediated remineralization*. *Acta Microscopica*, 2009. **18**(3).
75. Silva, C.C., et al., *Collagen-hydroxyapatite films: piezoelectric properties*. *Materials Science and Engineering: B*, 2001. **86**(3): p. 210-218.
76. Ferreira, A.M., et al., *Effect of type I collagen piezoelectricity on cellular adhesion*, in *Iv Latin American Congress on Biomedical Engineering 2007, Bioengineering*

- Solutions for Latin America Health, Vols 1 and 2*, C. MullerKarger, S. Wong, and A. LaCruz, Editors. 2008, Springer-Verlag Berlin: Berlin. p. 659-662.
77. Bonadio, J., et al., *Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration*. *Nature medicine*, 1999. **5**(7): p. 753-759.
78. Hutmacher, D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives*. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2001. **12**(1): p. 107-124.
79. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. *Tissue engineering*, 2001. **7**(6): p. 679-689.
80. Thomson, R., et al., *Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs*, in *Biopolymers li*. 1995, Springer. p. 245-274.
81. Hench, L.L. and J.M. Polak, *Third-generation biomedical materials*. *Science Signaling*, 2002. **295**(5557): p. 1014.
82. Jerome, R. and V. Maquet. *Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation*. in *Materials Science Forum*. (1997). Trans Tech Publ.
83. Ryan, G., A. Pandit, and D.P. Apatsidis, *Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications*. *Biomaterials*, 2006. **27**(13): p. 2651-2670.
84. Gunatillake, P.A. and R. Adhikari, *Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering*. *Eur Cell Mater*, 2003. **5**(1): p. 1-16.
85. Engel, E., et al., *Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side*. *Trends in biotechnology*, 2008. **26**(1): p. 39-47.
86. Jagur-Grodzinski, J., *Polymers for tissue engineering, medical devices, and regenerative medicine. Concise general review of recent studies*. *Polymers for Advanced Technologies*, 2006. **17**(6): p. 395-418.
87. Pillai, O. and R. Panchagnula, *Polymers in drug delivery*. *Current opinion in chemical biology*, 2001. **5**(4): p. 447-451.
88. Dee, K.C., D.A. Puleo, and R. Bizios, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. 2003: Wiley.
89. McPherson, J., S. Sawamura, and R. Armstrong, *An examination of the biologic response to injectable, glutaraldehyde cross-linked collagen implants*. *Journal of biomedical materials research*, 1986. **20**(1): p. 93-107.
90. Fratzl, P., et al., *Fibrillar structure and mechanical properties of collagen*. *Journal of structural biology*, 1998. **122**(1): p. 119-122.
91. Huang, L., R.P. Apkarian, and E.L. Chaikof, *High-resolution analysis of engineered type I collagen nanofibers by electron microscopy*. *Scanning*, 2001. **23**(6): p. 372-375.
92. Da Cruz, A.G.B., et al., *On the piezoelectricity of collagen/natural rubber blend films*. *European polymer journal*, 2003. **39**(6): p. 1267-1272.
93. Falini, G., et al., *Films of self-assembled purely helical type I collagen molecules*. *Journal of Materials Chemistry*, 2004. **14**(14): p. 2297-2302.
94. Gelse, K., E. Pöschl, and T. Aigner, *Collagens—structure, function, and biosynthesis*. *Advanced drug delivery reviews*, 2003. **55**(12): p. 1531-1546.

95. Abraham, L.C., et al., *Guide to collagen characterization for biomaterial studies*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008. **87**(1): p. 264-285.
96. Rabotyagova, O.S., ., P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation*. Materials Science and Engineering: C, 2008. **28**(8): p. 1420-1429.
97. Belbachir, K., et al., *Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009. **395**(3): p. 829-837.
98. Wright, N.T. and J.D. Humphrey, *Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process*. Annual review of biomedical engineering, 2002. **4**(1): p. 109-128.
99. *General Introduction to Bone: Collagen and Mineral* consultado em: <http://www.iupui.edu/~bbml/boneintro.shtml>. [Consultado a 5/10/2014].
100. Gartner, L.P., *Tratado de Histologia Em Cores*. 3th edition ed. 2007: Elsevier.
101. https://www.mun.ca/biology/scarr/Collagen_structure.html (Figure ©2000 by Griffiths et al.; All text material ©2005 by Steven M. Carr). [Consultado a 12/9/2014].
102. *Principles of cell biology* consultado em <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-17/CB17.html>. [Consultado a 20/3/2014].
103. Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 2005: W. H. Freeman.
104. *The Effects of Relative Humidity on Some Physical Properties of Modern Vellum: Implications for the Optimum Relative Humidity for the Display and Storage of Parchment* consultado em: <http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v10/bp10-09.html>. [Consultado a 11/10/2014].
105. Glowacki, J. and S. Mizuno, *Collagen scaffolds for tissue engineering*. Biopolymers, 2008. **89**(5): p. 338-344.
106. Wallace, D.G. and J. Rosenblatt, *Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2003. **55**(12): p. 1631-1649.
107. Rocha, L.B., G. Goissis, and M.A. Rossi, *Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing*. Biomaterials, 2002. **23**(2): p. 449-456.
108. Gu, X., et al., *Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration*. Progress in neurobiology, 2011. **93**(2): p. 204-230.
109. *Specialised Mammalian Cell Culture Reagents informações* em: <http://www.firstlinkuk.co.uk/table2.html>. [Consultado a 15/1/2014].
110. Giacometti, J.A., S. Fedosov, and M.M. Costa, *Corona charging of polymers: recent advances on constant current charging*. Brazilian Journal of Physics, 1999. **29**(2): p. 269-279.
111. Park, S., et al., *A ferroelectric photocatalyst for enhancing hydrogen evolution: polarized particulate suspension*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014. **16**(22): p. 10408-10413.

112. Barroca N. , G.P., Fernandes H. R., Almeida A. J. M., Fernandes H. V. , Vilarinho P. M., *Electrically poled biodegradable PLLA platforms for in situ bone tissue engineering*. to be submitted.
113. *Gel Electrophoresis of Proteins* consultado em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/35091.pdf>. [Consultado a 1/5/2014].
114. *SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)* consultado em <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>. [Consultado a 19/4/2014].
115. *Introduction to SDS-PAGE* consultado em: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>. [Consultado a 20/4/2014].
116. *Protein Characterization Outline* consultado em: <http://oregonstate.edu/instruct/bb450/spring14/lecture/proteincharacterizationoutline.html>. [Consultado a 20/4/2014].
117. Spink, C.H., *Differential scanning calorimetry*. Methods in cell biology, 2008. **84**: p. 115-141.
118. Schick, C., *Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2009. **395**(6): p. 1589-1611.
119. Goddard, J.M. and J.H. Hotchkiss, *Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds*. Progress in polymer science, 2007. **32**(7): p. 698-725.
120. *How Transmission Electron Microscopes Work* consultado em: <http://www.williambakhos.com/picshlz/how-transmission-electron-microscopes-work>. [Consultado a 3/10/2014].
121. Jalili, N., and K. Laxminarayana, *A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences*. Mechatronics, 2004. **14**(8): p. 907-945.
122. Merrett, K., et al., *Surface analysis methods for characterizing polymeric biomaterials*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2002. **13**(6): p. 593-621.
123. *Research on Biological Atomic Force Microscopy* consultado em: <http://web.physics.ucsb.edu/~hansma/biomolecules.htm>. [Consultado a 17/5/2014].
124. *AFM (Atomic Force Microscope)* consultado em: <http://www3.physik.uni-greifswald.de/method/afm/eafm.htm>. [Consultado a 20/5/2014].
125. *Electrostatic Force Microscopy - PtIr5 coating* consultado em: <http://www.nanoworld.com/pointprobe-electrostatic-force-microscopy-afm-tip-efm>. [Consultado a 11/6/2014].
126. Vadgama, P., *Surfaces and interfaces for biomaterials*. 2005: CRC Press Boca Raton Boston New-York Washington DC.
127. Yuan, Y. and T.R. Lee, *Contact angle and wetting properties*, in *Surface Science Techniques*. 2013, Springer. p. 3-34.
128. Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2007. **1767**(9): p. 1073-1101.

129. Theophanides, T.M., *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*. 2012: InTech.
130. Muyonga, J.H., C.G.B. Cole, and K.G. Duodu, *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus)*. Food Chemistry, 2004. **86**(3): p. 325-332.
131. *Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* consultado em http://life.nthu.edu.tw/~q894283/lifescience/BioPhyChem/IR/FTIR/IMAGE_FTIR.html. [Consultado a 7/6/2014].
132. Robinson, J.J., *Comparative biochemical analysis of sea urchin peristome and rat tail tendon collagen*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 1997. **117**(2): p. 307-313.
133. Lin, Y.K. and D.C. Liu, *Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species*. Food Chemistry, 2006. **99**(2): p. 244-251.
134. Gómez, K.K., et al. *Extraction and characterization of collagen from different biological tissues*. in *MEDICAL PHYSICS: Twelfth Mexican Symposium on Medical Physics*. 2012. AIP Publishing.
135. Deyl, Z. and I. Mikšik, *Advanced separation methods for collagen parent α -chains, their polymers and fragments*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2000. **739**(1): p. 3-31.
136. Zhang, Z., G. Li, and B. Shi, *Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes*. Journal-Society of Leather Technologists and Chemists, 2006. **90**(1): p. 23.
137. Zhang, X., et al., *Biochemical characterisation and assessment of fibril-forming ability of collagens extracted from Bester sturgeon *Huso huso* and Acipenser ruthenus*. Food chemistry, 2014. **160**: p. 305-312.
138. Miles, C.A., T.V. Burjanadze, and A.J. Bailey, *The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry*. Journal of molecular biology, 1995. **245**(4): p. 437-446.
139. Silva, C.C., et al., *Effect of the pH on the piezoelectric properties of collagen films*. Materials Science and Engineering: B, 2001. **83**(1): p. 165-172.
140. Angele, P., et al., *Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2831-2841.
141. Tang, H.R., A.D. Covington, and R.A. Hancock, *Use of DSC to detect the heterogeneity of hydrothermal stability in the polyphenol-treated collagen matrix*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(23): p. 6652-6656.
142. Mentink, C.J., et al., *Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin*. Clinica chimica acta, 2002. **321**(1): p. 69-76.
143. Stylianou, A. and D. Yova, *Surface nanoscale imaging of collagen thin films by atomic force microscopy*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(5): p. 2947-2957.

144. Graham, J.S., et al., *Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy*. Experimental cell research, 2004. **299**(2): p. 335-342.
145. Strasser, S., et al., *Structural investigations on native collagen type I fibrils using AFM*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **354**(1): p. 27-32.
146. Bozec, L., G. van der Heijden, and M. Horton, *Collagen fibrils: nanoscale ropes*. Biophysical journal, 2007. **92**(1): p. 70-75.
147. Baselt, D.R., J. Revel, and J.D. Baldeschwieler, *Subfibrillar structure of type I collagen observed by atomic force microscopy*. Biophysical journal, 1993. **65**(6): p. 2644-2655.
148. Su, H., et al., *The Ultrastructure of Type I Collagen at Nanoscale: Large or Small D-Spacing Distribution?* Nanoscale, 2014.
149. Bacakova, L., et al., *Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants*. Biotechnology advances, 2011. **29**(6): p. 739-767.
150. Meyer, U., U. Joos, and H.P. Wiesmann, *Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part I*. International journal of oral and maxillofacial surgery, 2004. **33**(4): p. 325-332.
151. Sammons, R.L., et al., *Comparison of osteoblast spreading on microstructured dental implant surfaces and cell behaviour in an explant model of osseointegration*. Clinical oral implants research, 2005. **16**(6): p. 657-666.
152. Anselme, K., A. Ponche, and M. Biggerelle, *Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: biological aspects*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 2010. **224**(12): p. 1487-1507.
153. Lim, J.Y., et al., *Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization*. Biomaterials, 2008. **29**(12): p. 1776-1784.
154. Ber, S., G.T. Köse, and V. Hasırcı, *Bone tissue engineering on patterned collagen films: an in vitro study*. Biomaterials, 2005. **26**(14): p. 1977-1986.
155. Nakamura, M. and K. Yamashita, *Polarization effect on wettability of bioceramic electrets*. Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on, 2012. **19**(4): p. 1247-1252.
156. Bodhak, S., S. Bose, and A. Bandyopadhyay, *Role of surface charge and wettability on early stage mineralization and bone cell-materials interactions of polarized hydroxyapatite*. Acta biomaterialia, 2009. **5**(6): p. 2178-2188.
157. Nakamura, M., et al., *Surface electric fields increase osteoblast adhesion through improved wettability on hydroxyapatite electret*. ACS applied materials & interfaces, 2009. **1**(10): p. 2181-2189.
158. Bonakdar, S., et al., *Comparison of the effect of hydrophilicity on biocompatibility and platelet adhesion of two different kinds of biomaterials*. Iran. J. Pharm. Sci, 2008. **4**(1): p. 37-44.
159. Ma, Z., Z. Mao, and C. Gao, *Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2007. **60**(2): p. 137-157.

160. Menzies, K.L. and L. Jones, *The impact of contact angle on the biocompatibility of biomaterials*. Optometry & Vision Science, 2010. **87**(6): p. 387-399.
161. Garcia, A.J., M.D. Vega, and D. Boettiger, *Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation*. Molecular Biology of the Cell Vol. 10, 785–798, March, 1999.
162. Barroca, N., "Scaffolds à base de polímeros piezoelétricos para regeneração óssea": Tese de mestrado do Departamento de Engenharia Cerâmica e do Vidro 2008, Universidade de Aveiro: Aveiro, 2008.
163. Nakamura, M., et al., *Improvement of Osteoblast Adhesion Through Polarization of Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings on Metal*. Journal of Medical and Biological Engineering, 2014. **34**(1): p. 44-48.
164. Kong, J. and S. Yu, *Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007. **39**(8): p. 549-559.
165. Gallagher, W., *FTIR analysis of protein structure*. Course manual Chem, 2009. **455**.
166. Wang, L., et al., *Preparation and characterisation of type I and V collagens from the skin of Amur sturgeon (< i> Acipenser schrenckii</i>)*. Food chemistry, 2014. **148**: p. 410-414.
167. Fernandes, L.L., et al., *Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering*. Polímeros, 2011. **21**(1): p. 1-6.
168. Saarakkala, S., et al., *Fourier transform infrared (FTIR) microspectroscopy of immature, mature and degenerated articular cartilage*. Microscopy: science, technology, applications and education, 2010. **1**: p. 403-14.
169. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(7): p. 667-681.
170. Mansur, H.S., et al., *Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels*. Materials Science and Engineering: C, 2009. **29**(5): p. 1574-1583.
171. Gardel, M., et al., *Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration*. Annual review of cell and developmental biology, 2010. **26**: p. 315-333.
172. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-1709.
173. Ohgaki, M., et al., *Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite*. Journal of biomedical materials research, 2001. **57**(3): p. 366-373.
174. Yamashita, K., N. Oikawa, and T. Umegaki, *Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling*. Chemistry of materials, 1996. **8**(12): p. 2697-2700.
175. Schneider, G.B., et al., *The effect of hydrogel charge density on cell attachment*. Biomaterials, 2004. **25**(15): p. 3023-3028.
176. Kizuki, T., et al., *Effect of bone-like layer growth from culture medium on adherence of osteoblast-like cells*. Biomaterials, 2003. **24**(6): p. 941-947.