

Supervisor: Abel Oliva (ITQB-NOVA) and Filomena Freitas (FCT-UNL)

Supervisor(s) email address: filofreitas0@gmail.com ; oliva@itqb.unl.pt

Lab/Institution: UCIBIO-REQUIMTE/FCT-UNL e ITQB-NOVA

TITLE: Desenvolvimento de substratos biopoliméricos para crescimento de derme reconstruída.

BACKGROUND

A utilização de um suporte (scaffold) para o cultivo de células que permita manter a morfologia *in vivo*, assim como comportamento e resposta fisiológica num sistema modelo *in vitro* é uma meta fundamental para o teste de fármacos e de terapias *in vitro*, sem necessidade de utilizar animais de laboratório. Para esse fim, pretende-se um suporte que permita o crescimento celular de fibroblastos conservando a sua forma natural e que podem interagir livremente com as células vizinhas em 3D para que eles funcionem de uma maneira mais fisiologicamente relevante. As células a utilizar têm cerca de 10-25 µm de tamanho e são raramente mais do que 0-50 µm de outra célula ou 100-200 µm de uma fonte de nutrientes via capilar sanguíneo. Pretende-se assim recriar esta complexa organização e ambiente celular que modele os tecidos nativos, de forma a poder desenvolver estudos de comportamento, função e interação das células, sem as limitações que apresentam os modelos 2D convencionais.

O desenvolvimento de pele humana reconstruída em laboratório é de elevado interesse para produzir uma plataforma modelo de teste para fármacos, estudos fisiológicos ou de indução de fenótipos doentes e avaliação de terapias. A utilização de suportes poliméricos para o estabelecimento de culturas celulares que permitam reproduzir a estrutura da derme e permitir a deposição de queratinócitos para completar a epiderme, permitiria a redução de variabilidade e a reconstrução de peles totalmente humana, a partir de células primárias de homem. Quando as células crescem e dividem ocupando o espaço 3D dentro de uma matriz com as dimensões adequadas, mantem a forma natural e permite as interações complexas com o entorno, imitando o crescimento normal em tecidos. As células podem expressar a matriz extracelular permitindo um estudo morfológico e fisiológico muito mais próximo da situação *in vivo*.

A utilização bio-polímeros hidrofóbicos e biocompatíveis, nomeadamente, polihidroxicanoatos (PHA), nos quais é implementada uma porosidade predefinida (poros de 30-60 µm, interconectados) permitirá a introdução e crescimento de fibroblastos humanos, que criarão as condições para o estabelecimento e estratificação da epiderme na superfície, possibilitando a obtenção de um perfil histológico que modela a pele humana. Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres naturais que podem ser sintetizados por muitas bactérias como reservas intracelulares de energia e carbono. Dependendo da sua composição, os PHA possuem propriedades que variam desde termoplásticos rígidos e cristalinos, até elastómeros flexíveis e pouco cristalinos.

OBJECTIVES

Desenvolvimento de pele humana reconstruída em laboratório tendo como base um poliéster natural

PROJECT DESCRIPTION

Tarefa 1 – Produção e caracterização dos biopolímeros.

Cultivo bacteriano em bioreactor para produção de PHA. Serão utilizadas culturas bacterianas diferentes para obter biopolímeros com diferentes propriedades físicas, nomeadamente, um termoplástico cristalino (polihidroxibutirato, PHB) e um elastómero (PHA de cadeia média, mcl-PHA).

Os biopolímeros serão extraídos da biomassa por Soxhlet, utilizando clorofórmio, e purificados por precipitação em etanol. Os biopolímeros purificados, obtidos após evaporação dos solventes, serão caracterizados em termos de composição (por cromatografia gasosa), peso molecular (por SEC), propriedades térmicas (por DSC/TGA) e cristalinidade (por difração de raios X).

Tarefa 2 – Preparação e caracterização das estruturas porosas.

Serão preparados filmes porosos de cada polímero isoladamente e também em mistura, utilizando diferentes técnicas, incluindo adição de sal, liofilização, CO₂ supercrítico, etc. Serão definidas as condições que resultam na obtenção de estruturas com espessura de 200 µm e porosidade interconectada (30-60 µm) de forma reprodutível.

As estruturas obtidas serão caracterizadas em termos de propriedades térmicas (DSC/TGA), propriedades mecânicas (testes de tensão, torção, compressão, etc.) e morfologia (por SEM).

Tarefa 3 - Estabelecimento de culturas de fibroblastos nos suportes biopoliméricos.

Utilizando os suportes preparados, serão esterilizados e acondicionados para semear as células de fibroblastos em meio nutritivo e incubados durante períodos de tempo até produzir colagénio. Serão avaliadas as características de crescimento celular, da interconexão das células e a adaptação das células aos suportes, incluindo a otimização das condições de cultivo, a frequência da renovação dos meios de cultura e as condições mais adequadas para a ocupação do lúmen dos poros presentes no suporte. Numa fase final poderão ser incluídos ensaios com a deposição de queratinócitos para a formação de pele 3D reconstruída (derme e epiderme).