

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Manuel Adalberto Alfaro De Prá

MATRIZES NANOESTRUTURADAS BIOATIVAS PARA
APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS

Florianópolis
2017

Manuel Adalberto Alfaro De Prá

**MATRIZES NANOESTRUTURADAS BIOATIVAS PARA
APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO DE NERVOS PERIFÉRICOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

De Prá, Manuel Adalberto Alfaro
Matrizes nanoestruturadas bioativas para
aplicação na regeneração de nervos periféricos /
Manuel Adalberto Alfaro De Prá ; orientador,
Marcelo Maraschin, 2017.
138 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

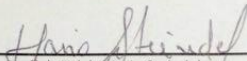
1. Biotecnologia e Biociências. 2.
Nanotecnologia. 3. Eletrofiação. 4. Medicina
regenerativa. 5. Sistemas de Liberação controlada.
I. Maraschin, Marcelo . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Matrizes nanoestruturadas bioativas para aplicação na regeneração de nervos periféricos"

Por

Manuel Adalberto Alfaro de Prá

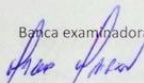
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (08/PPGBT/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



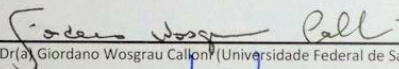
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

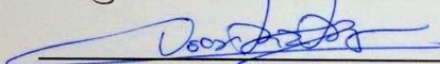
Banca examinadora:



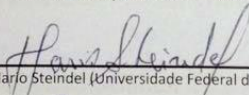
Dr(a) Marcelo Maraschin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



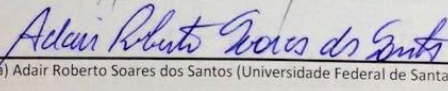
Dr(a) Giordano Wosgrau Calloni (Universidade Federal de Santa Catarina)



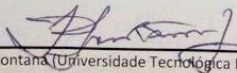
Dr(a) Oscar Bruna Romero (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Mario Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) José Domingos Fontana (Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

Florianópolis, 24 de março de 2017.

“Há um tempo para algumas coisas, e outro para todas/ um tempo para as grandes coisas, e outro para as pequenas”.

Miguel de Cervantes Saavedra

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Marcelo Maraschin, por me aceitar como orientando, pelos ensinamentos, confiança, incentivo e suporte para a realização deste e de outros trabalhos.

À Natércia Martins, pelo apoio, companheirismo e incentivo.

Aos meus pais, Tito e Tânia, pela educação e apoio.

À Dra. Beatriz Veleirinho, pelos ensinamentos e importantes contribuições para a realização deste e de outros trabalhos.

À Dra. Letícia Mazzarino, pelas importantes colaborações e amizade.

À todos os colegas do LMBV, pela amizade, crescimento pessoal e profissional.

À todos os colegas e funcionários do laboratório central de microscopia eletrônica, em especial à Susy.

À todos os colegas e funcionários do CEBIME, em especial à Martina.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC, pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores da banca por gentilmente aceitarem avaliar este trabalho.

Ao apoio financeiro da FAPESC/CNPq e CAPES e Fundação CERTI.

RESUMO

A eletrofiação é uma promissora técnica à geração de sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos. Este trabalho descreve o desenvolvimento de matrizes nanoestruturadas permissivas à diferenciação de células neuronais. Inicialmente, o efeito dos parâmetros processuais da eletrofiação e da configuração do coletor na arquitetura das fibras foi estudado. O processo foi otimizado para obtenção de nanofibras randomizadas e alinhadas. Nanofibras de policaprolactona (PCL) foram produzidas usando três configurações de coletor: um cilindro metálico rotatório, fios de cobre e um mandril rotatório. O coletor cilíndrico gerou uma nanomatriz com estrutura típica tridimensional, na qual a velocidade de rotação mecanicamente promoveu a redução do diâmetro e alinhamento das fibras. Um padrão de fibras randomizadas com um diâmetro médio de 1142 ± 391 nm foi observado a 0 rpm, enquanto nanofibras alinhadas com um diâmetro médio de 663 ± 334 nm foram produzidas a 2000 rpm. Os cabos de cobre originaram um novo padrão de matriz, cujo grau de orientação das fibras relacionou-se à distribuição do campo elétrico no coletor. Por sua vez, o coletor de mandril deu origem a uma matriz tubular constituída de fibras com diâmetro médio de 606 ± 329 nm. Em seguida, avaliou-se a influência do efeito do polietilenoglicol (PEG) em nanofibras compostas por blendas de PEG e PCL. Três tipos de PEG consoante à massa molecular (400, 1500, e 35000 Da) e três concentrações (1, 5, e 10% em relação à PCL) foram estudados. As matrizes foram caracterizadas quanto a sua arquitetura por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e propriedades mecânicas por teste de tração uniaxial, utilizando um analisador de textura. Em presença de PEG houve uma redução do diâmetro e da resistência mecânica das fibras. Estudos de cultura celular demonstraram a ausência de citotoxicidade destes biomateriais. A adequação do uso do PEG para prolongar a liberação de NGF foi demonstrada. A bioatividade do NFG incorporado nas matrizes foi avaliada através da diferenciação de células PC12. As matrizes constituídas de nanofibras alinhadas promoveram o alinhamento de neuritos e a presença de PEG influenciou positivamente o perfil de liberação do NGF e a degradabilidade das matrizes. Por fim, foi produzido um sistema de liberação prolongado de NGF constituído por uma matriz tubular de nanofibras randomizadas na camada externa e alinhadas no lúmen. Os resultados obtidos indicam que as matrizes desenvolvidas, constituídas de nanofibras de PCL e PEG, apresentam

potencial de aplicação como sistema de liberação de NGF e no estudo da regeneração nervosa periférica.

Palavras-chave: Eletrofição. Nanofibras. Policaprolactona. Polietilenoglicol. Fator de crescimento do nervo, NGF. Sistema de liberação de fármacos. Lesões de nervos. Células de feocromocitoma PC 12. Fibroblastos L929.

ABSTRACT

Electrospinning is a promising technique to generate scaffolds for delivery systems and nerve tissue engineering. This study describes the development of a nanostructured matrix permissive to neural cell differentiation. Firstly, the effect of setting up parameters and collector design on the alignment and architecture of *electrospinning* fibers was studied. The process was optimized to obtain randomized and aligned nanofibers. Polycaprolactone (PCL) fibers were produced using three collectors: metallic rotating drum, copper wires, and a rotating mandrel. The drum collector produced a typical tridimensional structure whereby the rotational speed mechanically stretches fibers and affects their diameter and alignment. Randomly oriented fibers with an average diameter of 1142 ± 391 nm were obtained at 0 rpm, while aligned fibers with an average diameter of 663 ± 334 nm were produced at 2000 rpm. Static copper wires produced a novel fiber pattern in which the degree of orientation of the fibers was related to the electrical field distribution along the collector. Mandrel collector produced a tubular mat composed by nanofibers with an average diameter of 606 ± 329 nm. In a second series of experiments, the influence of polyethyleneglycol (PEG) on nanofibers composed of PCL and PEG blends was evaluated. Three types of PEG with different molecular weights (400, 1500, and 35000 Da) and concentrations (1, 5, and 10% ratio to PCL) were studied. Mats were characterized in terms of architecture by Scanning Electron Microscopy (SEM) and mechanical properties by uniaxial tensile tests using a texture analyser. The presence of PEG decreased the diameter and mechanical resistance of fibers. Cell culture studies have demonstrated the absence of cytotoxicity of these biomaterials. The suitability of using polyethylene glycol (PEG) to prolong the delivery of NGF incorporated into PCL *electrospinning* nanofibers was demonstrated. The effect of released nerve growth factor (NGF) from the mats was evaluated by neuronal differentiation using PC12 cells. Electrospun scaffolds composed by aligned nanofibers promoted alignment and neurite outgrowth of PC12 cells along the axis of the aligned nanofibers. PEG influenced positively the release profile of NGF and mats degradability. Finally, a sustained NGF delivery system composed by a tubular matrix of randomized nanofiber in the outer layer and aligned nanofibers in the lumen was produced. Therefore, the results obtained indicate that the developed matrix, composed by PCL and PEG nanofibers, present potential application as a NGF delivery system and in the study of the peripheral nervous regeneration.

Keywords: *Electrospinning*. Nanofibers. Polycaprolactone. Polyethyleneglycol. Nerve growth factor, NGF. Drug delivery system. Nerve injury. PC12 rat adrenal pheochromocytoma cell line. L929 mouse fibroblast cell line.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração de um sistema de <i>electrospinning</i> (Adaptado de VELEIRINHO <i>et al.</i> , 2012).	3
Figura 2. Ilustração da instabilidade de torção ao longo do cone de Taylor (Adaptado de RENEKER & YARIN, 2008).	4
Figura 3. Ilustração da estrutura do nervo (MARIEB & HOEHN, 2006).	7
Figura 12. Influência da redução do fluxo de infusão na frequência de distribuição	43
Figura 13. MEV e respectivas frequências de distribuição de diâmetro médio de nanofibras produzidas com um coletor de cabos paralelos....	43
Figura 14. Análise de alinhamento das nanofibras mostrando o seu desvio de orientação	44
Figura 15. MEV do padrão de nanofibras produzidas utilizando-se coletor de fios de cobre paralelos.	45
Figura 16. <i>Scaffold</i> tubular produzido com o coletor de mandril ajustado a uma velocidade de rotação de 2000 rpm	46
Figura 17. MEV e as respectivas frequências de distribuição do diâmetro das fibras de matrizes constituídas de PCL, PCL/PEG 400, PCL/PEG 1500 e PCL/PEG 35000	48
Figura 18. Efeito do PEG no diâmetro e nas propriedades mecânicas de nanofibras constituídas por PCL ou por blends de PCL e PEG.....	49
Figura 19. Citotoxicidade indireta de matrizes de PCL e PCL/PEG para linhagem celular de fibroblastos L929, através do método de MTT	51
Figura 20. Citotoxicidade indireta de matrizes de PCL e PCL/PEG através do método agarose overlay..	52
Figura 21. Micrografias óticas de células PC12 cultivadas em meio RPMI fresco e adicionado de 50 ng/ml de NGF.	53
Figura 24. Liberação e bioatividade do NGF liberado de matrizes de PCL/PEG 35000.....	57
Figura 25. Arquitetura das matrizes de PCL e PCL/PEG avaliada após o estudo de liberação de NGF (28 dias)	58
Figura 26. Perda de massa de matrizes de PCL e PCL/PEG após 28 dias de exposição ao meio de cultura RPMI.....	59

Figura 27. *Scaffold* tubular constituído por nanofibras de PCL alinhadas na face interna e nanofibras randomizadas de PCL/PEG 35 kDa contendo NGF (12µg/mL) na face externa..... 60

Figura 28. Efeito do *scaffold* tubular na diferenciação de células PC12.. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio e propriedades mecânicas das matrizes de PCL e PCL/PEG.	50
Tabela 2. Diâmetro médio de matrizes de PCL e PCL/PEG antes (t_0) e após (t_{28d}) a exposição ao meio de cultura.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância

DAPI - (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

DMEM - Dulbecco's minimal essential medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

ES - *Electrospinning*

HEPES - (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

L929 - Linhagem celular de fibroblastos murinos

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

NGF - Fator de crescimento do nervo

PBS - Phosphate-buffered saline

PC12 - Linhagem celular de feocromocitoma de adrenal de ratos

PCL - Policaprolactona

PEG - Polietilenoglicol

SDS - Sodium dodecil sulfate

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Nanofibras poliméricas produzidas por eletrofiação (electrospinning).....	2
1.2	Lesão de nervos periféricos	6
1.3	Guias e envoltórios para a regeneração de nervos.....	12
1.4	Materiais produzidos por eletrofiação para aplicação em lesões de tecidos nervosos.....	18
1.5	Aplicação da PCL em medicina	23
2.	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos.....	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Material	30
3.2	Obtenção das matrizes poliméricas constituídas por micro e nanofibras	30
3.2.1	Obtenção das matrizes de micro e nanofibras de PCL e PCL/PEG	31
3.2.2	Obtenção do sistema de liberação de NGF.....	31
3.3	Caracterização das matrizes.....	32
3.4	Determinação das propriedades mecânicas das matrizes de PCL e PCL/PEG	32
3.5	Estudos de cultura celular.....	32
3.5.1	Citotoxicidade.....	33
3.5.2	Ensaio de difusão em gel de agarose (agarose overlay)	33
3.5.3	Influência da arquitetura das matrizes na morfologia celular.....	34
3.5.4	Bioatividade do NGF incorporado ao sistema de liberação	35
3.6	Avaliação da degradação das nanomatrizes por gravimetria.....	35
3.7	Análise estatística	35
4.	RESULTADOS	37
4.1	Influência do sistema de solventes e concentração da solução polimérica, do fluxo de infusão e da configuração do equipamento de electrospinning na obtenção de nanofibras de PCL.....	38
4.2	Influência do PEG em nanofibras de PLC.....	47
4.3	Estudos de cultura celular.....	51
4.3.1	Citotoxicidade.....	51
4.3.2	Avaliação das matrizes de PCL e PCL/PEG como suportes (scaffolds) para cultura celular e sistema de liberação de NGF..	53
5.	DISCUSSÃO	63

5.1	Influência do sistema de solventes e concentração da solução polimérica, do fluxo de infusão e da configuração do equipamento de electrospinning na obtenção de nanofibras de PCL.....	64
5.2.	Influência do PEG em nanofibras de PLC	69
5.1	Avaliação das matrizes de PCL e PCL/PEG como suportes (scaffolds) para cultura celular e sistema de liberação de NGF ..	70
6.	CONCLUSÕES	75
7.	REFERÊNCIAS	79
8.	APÊNDICE	103
	Publicação: “ <i>Effect of collector design on the morphological properties of polycaprolactone electrospun fibers</i> ”	104
	Publicação: “ <i>The Effect of polyethylene glycol on polycaprolactone electrospun scaffolds: morphology, mechanical properties and nerve growth factor delivery profile</i> ”	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanofibras poliméricas produzidas por eletrofiação (*electrospinning*)

A eletrofiação (*electrospinning* – ES) é uma tecnologia aplicada à obtenção de nanomateriais formados pela deposição de nanofibras poliméricas, as quais formam uma rede tridimensional interconectada. Devido ao diâmetro extremamente reduzido destas nanofibras, as matrizes obtidas por ES dispõem de uma grande área de superfície em relação ao volume e alta porosidade. Ademais, é possível obter matrizes a partir de centenas de diferentes polímeros, capazes de carrear substâncias bioativas. Devido a estas características, seu potencial de aplicação é amplamente demonstrado em inúmeras áreas como, por exemplo, filtros de alta performance, têxteis inteligentes, fotônica, eletrônica, sensores, biorremediação, diagnóstico, *scaffolds* para engenharia de tecidos e sistemas de liberação de fármacos (BHARDWAJ & KUNDU, 2010; LU, SUN & JIANG, 2014)

O processo de ES envolve fenômenos eletrohidrodinâmicos cujas primeiras observações tiveram início no século XVII (PERSANO *et al*, 2013). Posteriormente, o potencial comercial de processos envolvendo campo elétrico induzido para obtenção de fibras a partir de líquidos compostos foi percebido, e tecnologias relacionadas foram patenteadas por Cooley (1902), Morton (1902) e Formhals (1934). Entretanto, apenas em 1936 o cientista russo Petryanov-Sokolov e colaboradores conduziram a pesquisa que levou à produção industrial de fibras finas através de campos eletrostáticos. Estes filtros ficaram conhecidos como filtros de Petryanov. Esta atividade científica foi determinada como segredo militar pelo governo da extinta União Soviética, e nunca foi publicada à comunidade científica internacional. Estes materiais ganharam ampla aplicação, incluindo a proteção contra aerossóis nucleares. Em reconhecimento à estes trabalhos, Petryanov e seu grupo de pesquisa foram premiados com o prêmio Lenin, a maior honraria daquele país (LUSHNIKOV, 1996).

Décadas mais tarde, o primeiro produto comercial baseado em nanofibras foi lançado nos Estados Unidos pela empresa Donaldson (Donaldson Co. Inc, MI, USA), no início dos anos oitenta, e pela DuPont (Dupont Co., NC, USA), em 1989. Entretanto, apenas em 1995 os trabalhos realizados por SRINIVASAN & RENEKER (1995) e DOSHI & RENEKER (1995) evidenciaram a natureza nanoestruturada das nanofibras, o que despertou o grande interesse da comunidade científica e da indústria pelo tema. Desde então, mais de 2500 artigos e 940 patentes foram publicadas e estes números crescem constantemente. O foco

principal destas patentes concentra-se no desenvolvimento de meios de filtração, na metodologia e em melhorias no equipamento. Atualmente, o ES consiste na principal tecnologia para obtenção de nanofibras poliméricas. As empresas que atuam na área dedicam-se à venda de equipamentos e, principalmente, de produtos para filtração. Por outro lado, o escalonamento do processo ainda apresenta desafios como a baixa reprodutibilidade e precisão e a dificuldade de produção em larga escala, o que limita a aplicação destes nanomateriais, principalmente na área biomédica. Apesar destes desafios, há uma expectativa da sua aplicação à médio prazo, tendo em vista o significativo número de patentes depositadas e a avaliação de produtos baseados em nanofibras por empresas nascentes de universidade (*spin-offs*) e companhias farmacêuticas (PERSANO *et al*, 2013).

A **figura 1** ilustra um sistema de ES de escala laboratorial que emprega uma fonte de alta voltagem, para formação de um campo elétrico, uma bomba para infusão de uma solução polimérica e um coletor metálico para a deposição de nanofibras.

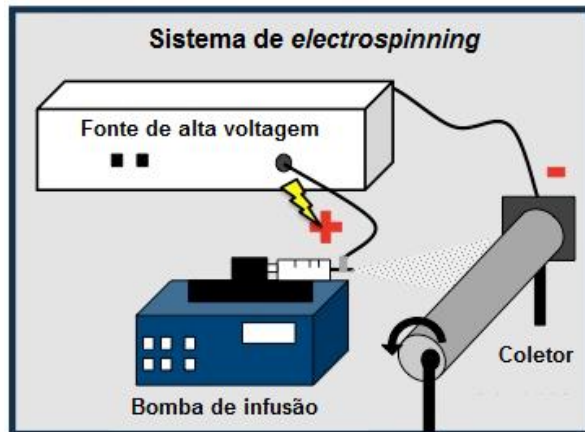


Figura 1. Ilustração de um sistema de *electrospinning* (Adaptado de VELEIRINHO *et al.*, 2012).

Nesta tecnologia, utiliza-se a aplicação de um gradiente de potencial elétrico sobre uma solução polimérica. A formação de nanofibras se inicia quando o fluxo de elétrons aplicado sobre a solução polimérica é suficiente para mudar a forma da gota esférica da solução, localizada na extremidade da agulha, para um formato cônico, conhecido como cone de Taylor. Quando a tensão superficial da solução é superada

pela força do campo elétrico, cargas eletrostáticas induzem a movimentação do fluido, a partir da extremidade do cone de Taylor, através do campo elétrico. Um jato eletricamente carregado é originado em direção ao coletor, geralmente constituído por um metal condutor (RENEKER *et al.*, 2000). Forças eletrostáticas externas e forças repulsivas entre as cargas que carregam o jato, inerentes ao processo, geram um movimento em espiral denominado instabilidade de torção (*bending instability*) (**figura 2**). Portanto, numa série de eventos governados pela instabilidade de torção, ocorre o carreamento e estiramento da solução polimérica, evaporação do solvente, redução do diâmetro à ordem dos nanômetros, solidificação e deposição de nanofibras contínuas (FENNESSEY & FARRIS, 2004; RENEKER & YARIN, 2008).

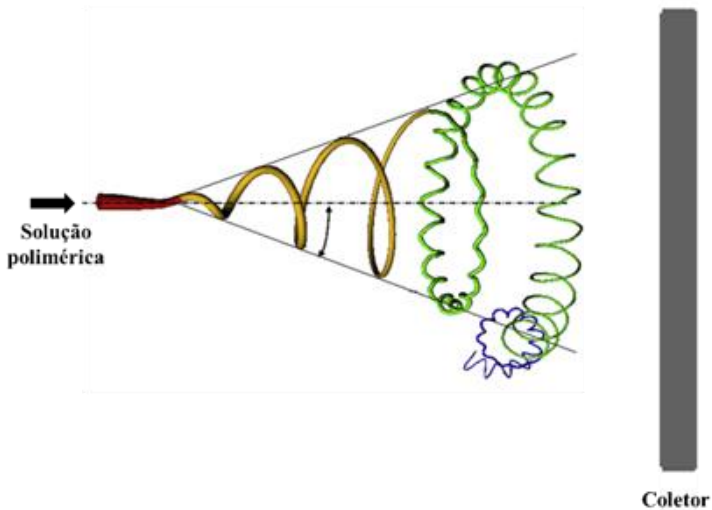


Figura 2. Ilustração da instabilidade de torção ao longo do cone de Taylor (Adaptado de RENEKER & YARIN, 2008).

As propriedades físico-químicas e estruturais das matrizes nanofibrosas são determinadas fundamentalmente pelas características da solução polimérica (polímero e sistema de solventes), da configuração do equipamento e dos parâmetros do processo de *electrospinning*. Atualmente, mais de 200 diferentes polímeros sintéticos e naturais, ou ainda misturas de polímeros, incluindo proteínas e polissacarídeos, já foram utilizados para a produção de nano e microfibras (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). Em relação à solução polimérica, o peso molecular do

polímero, a viscosidade da solução e as características do sistema de solventes, como volatilidade e potencial isoelétrico, são as principais variáveis. Em relação ao processo, o fluxo da solução, a distância entre a agulha e a seringa (distância de trabalho), a voltagem aplicada para a geração do campo elétrico, o formato e características do sistema coletor e as condições ambientais são os parâmetros que influenciam de forma determinante a arquitetura das fibras. Todas estas variáveis atuam de forma interdependente, tanto no processo quanto na estrutura dos materiais obtidos, e devem ser avaliadas durante o desenvolvimento de um novo biomaterial (GARG & BOWLIN, 2011).

Na área biomédica, uma das suas principais aplicações é obtenção de arcabouços (*scaffolds*) para a regeneração tecidual e engenharia de tecidos. O desenvolvimento destes arcabouços envolve não só a escolha de um material biodegradável e biocompatível, mas também com propriedades físicas e morfológicas que favoreçam o crescimento e a diferenciação celular (DE RUITER *et al.*, 2010). Matrizes tridimensionais nanoestruturada obtidas através da tecnologia de ES podem fornecer uma estrutura favorável à adesão e proliferação celular, mimetizando a matriz extracelular (MEC) e servindo de suporte ao crescimento celular. Além disso, a porosidade das nanomatrizes pode ser adequada à permeação de substâncias necessárias à manutenção da viabilidade celular, permitindo o influxo de nutrientes e gases e o efluxo de produtos do metabolismo celular sem, no entanto, permitir a infiltração de células inflamatórias na lesão (LUU *et al.*, 2003). Dessa forma, a estrutura destes *scaffolds* deve ser projetada considerando as características do tecido lesionado, de forma a otimizar a adesão, o crescimento e a proliferação celular visando uma regeneração tecidual adequada (RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2014).

Além disso, esta tecnologia permite a incorporação de substâncias ativas como drogas, ácidos nucleicos, peptídeos e células em polímeros naturais ou sintéticos, sendo ideal à formação de um sistema controlado de liberação destas substâncias. Fatores como a alteração da composição do polímero e dos parâmetros do processo podem ser manipulados para gerar *scaffolds* de diferentes geometrias e com propriedades estruturais, cinéticas, mecânicas e biológicas dedicadas a determinado objetivo (LUU *et al.*, 2003).

Neste trabalho, serão abordados: a influência dos parâmetros processuais para produção de nanofibras de policaprolactona e o potencial de aplicação de nanofibras constituídas de policaprolactona e polietilenoglicol como *scaffolds* e sistema de liberação de fator de crescimento do nervo para regeneração nervosa periférica.

1.2 Lesão de nervos periféricos

Os nervos do sistema periférico são estruturas cuja função é a integração das funções sensitivas e motoras dos organismos vertebrados, através da transmissão do impulso nervoso entre os diversos órgãos e o sistema nervoso central. A interrupção da continuidade destas estruturas, por eventos traumáticos, resulta no bloqueio da transmissão destes impulsos e na desorganização de suas atividades funcionais (LIAO *et al.*, 2013).

As lesões de nervos periféricos são consideradas um significativo problema de saúde pública e apresentam em geral um alto potencial incapacitante associado a graves danos sociais e econômicos. Os pacientes acometidos frequentemente sofrem com o comprometimento das funções autônomas, dor neuropática, perda da massa muscular, da função tátil e dos movimentos. Eventos traumáticos como acidentes com veículos de transporte, objetos cortantes, quedas, esmagamentos e acidentes de trabalho são os principais fatores etiológicos e determinantes da gravidade deste tipo de lesão. Nos Estados Unidos são realizados anualmente cerca de duzentos mil procedimentos para reparo de nervos periféricos gerando um custo de aproximadamente sete bilhões de dólares (ICHIHARA, *et al.*, 2008; LIAO *et al.*, 2013).

Os nervos organizam-se em feixes de fibras nervosas constituídos de células neuronais, gliais e estromais, vasos sanguíneos e estruturas formadas de tecido conjuntivo. Cada fibra é formada por um axônio que pode ou não estar envolto por uma estrutura denominada bainha de mielina. Esta estrutura é originada por células gliais especializadas denominadas células de Schwann que, além de formarem a mielina, fornecem suporte trófico ao nervo através da liberação de neurotrofinas. A bainha de mielina tem a função de aprimorar a condução do impulso nervoso por intermédio da delimitação das regiões das transferências iônicas ao longo do axônio. Estas regiões, denominadas nódulos de Ranvier, são espaçamentos amielinizados contendo aglomerados de canais de sódio sensíveis à voltagem e localizam-se ao longo da camada de mielina que envolve o axônio (RANVIER, 1889; SHERMAN & BROPHY 2005). A presença destas estruturas resulta numa rápida propagação do potencial de ação e da transmissão do impulso nervoso. Este tipo de transmissão é denominada condução saltatória e é característica em tecidos nervosos periféricos com presença de mielina (GEUNA *et al.*, 2009). A estrutura formada pelo axônio, bainha de mielina e células de Schwann é completamente envolvida por uma camada de tecido conectivo denominada endoneuro. Este tecido é elástico

e resistente e tem função estrutural e protetora. Uma série de estruturas formadas pelo axônio, bainha de mielina, célula de Schwann e endoneuro são agrupadas e esta união forma os fascículos nervosos. Cada fascículo é envolvido por uma camada de tecido conectivo denso e resistente denominada perineuro. O perineuro tem a função de manter a pressão intrafascicular, auxiliar na manutenção do fluxo axoplasmático e formar uma barreira protetora entre as fibras nervosas e outros tecidos. Uma terceira camada de tecido conjuntivo forma uma estrutura denominada epineuro externo, que engloba todos os fascículos constituintes da estrutura do nervo (**Figura 03**). Tanto o perineuro como o epineuro externo são mais espessos ao nível das articulações, exercendo uma importante função protetora necessária durante os movimentos (GEUNA *et al.*, 2009).

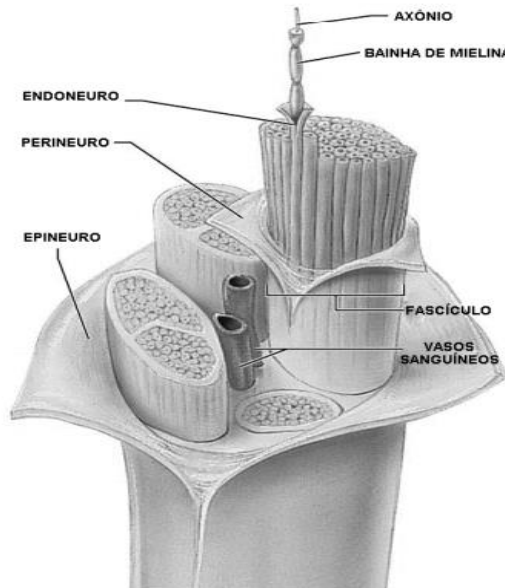


Figura 3. Ilustração da estrutura do nervo (MARIEB & HOEHN, 2006).

As lesões de nervos periféricos são classificadas de acordo com a sua gravidade. Seddon classificou as lesões em três níveis: neuropraxia, axonotmese e neurotmese; considerando a severidade, o prognóstico e o tempo de recuperação (SEDDON, 1943). Segundo esta classificação, a neuropraxia corresponde a uma lesão moderada resultando na perda da condução do impulso nervoso, mas sem ruptura do axônio ou do

perineuro (WALDRAM, 2003). A axonotmese considera a lesão de axônios e da bainha de mielina sem o comprometimento severo do tecido conectivo fascicular (endoneuro, epineuro e perineuro). A axonotmese está frequentemente associada a lesões por esmagamento. Em ambos os casos a recuperação motora e sensorial é completa. A neurotmese é o grau mais severo de lesão e resulta da secção total acarretando um comprometimento de todos os constituintes teciduais de uma determinada região do nervo. Nestes casos, a recuperação sensorial e motora geralmente depende de intervenção cirúrgica. Este tipo de lesão está associado a acidentes com objetos perfurocortantes, drogas nocivas e estiramentos (ROBINSON & SPENCER., 2006).

Sunderland desenvolveu uma classificação mais detalhada das lesões de nervos e incluiu cinco graus de severidade (SUNDERLAND, 1951). O primeiro grau corresponde à neuropraxia e o segundo a axonotmese. O terceiro grau corresponde a lesões com comprometimento do perineuro, além do axônio e da bainha de mielina. Neste tipo de lesão a recuperação é lenta e incompleta. A taxa de crescimento dos neuritos nas lesões de grau dois e três é de aproximadamente um milímetro por dia. Nas lesões de grau quatro ocorre a transecção total do nervo e corresponde a neurotmese. Nas lesões de grau cinco considera-se uma combinação variável das lesões de grau um a quatro citadas anteriormente. Nestes casos, a recuperação pode ser insatisfatória ou inexistente, dependendo do grau da lesão. Estas classificações são usadas pelos cirurgiões e neurocientistas para determinar o tipo de lesão e o seu tratamento. A classificação de Seddon é considerada de maior relevância para uma abordagem eletrofisiológica, enquanto a classificação de Sunderland tem uma maior aplicabilidade para a avaliação da necessidade de procedimentos cirúrgicos (CHHABRA *et al.*, 2014).

O dano tecidual causado pelo trauma dá início a uma sequência de sinalização complexa e a uma série de eventos moleculares. A perda da integridade da membrana celular axonal promove a entrada de cálcio e sódio do meio extracelular para o axoplasma. Este influxo de íons origina um potencial de ação que é o primeiro sinal para desencadear o transporte retrógrado de proteínas do axoplasma para o soma e à cromatólise, que corresponde à dissolução dos corpos de Nissl, migração do núcleo do centro para a periferia do soma e aumento do corpo celular. Os eventos cromatolíticos são mediados não apenas pelo rápido aumento do cálcio, mas também pelo aumento do AMPc (**figura 4**) (HANZ *et al.*, 2003; MANDOLESI *et al.*, 2004). Estes fenômenos dão início às alterações metabólicas necessárias à regeneração, ao alongamento axonal e à reinervação de órgãos alvos. Os neurônios passam de um estado

neurotransmissor para um estado neuroregenerativo de metabolismo intenso, reações anabólicas e expressão de proteínas necessárias ao desenvolvimento de um novo axoplasma que irá invadir o tubo endoneural distal e permitir a reinervação e a restituição das suas funções. O entendimento destes eventos é de imprescindível relevância à compreensão da fisiopatologia da lesão e busca de inovações terapêuticas (RAIVICH; HELLWEG; KREUTZBERG, 1991; AGTHONG *et al.*, 2006; PLUNET; KWON; TETZLAFF, 2002; ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

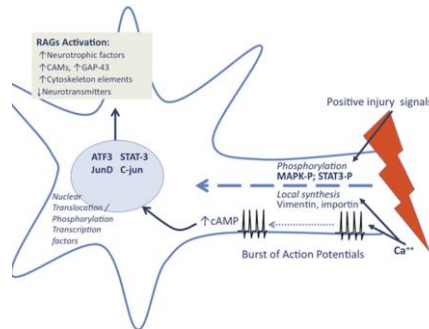


Figura 4. Sequência de sinalização originada pela lesão da membrana axonal (ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

As condições do microambiente no local da lesão são determinantes para o processo regenerativo. A extremidade proximal do nervo lesionado deve encontrar um ambiente permissivo e favorável ao crescimento axonal. Substâncias como as proteoglicanas (sulfato de condroitina, por exemplo) e moléculas inibitórias ao processo regenerativo associadas à mielina criam um ambiente desfavorável ao crescimento axonal e prejudicam a regeneração. Para criar um ambiente permissivo ao crescimento axonal, na extremidade distal ocorre um processo denominado degeneração Walleriana, enquanto que no segmento proximal, este processo é conhecido como degeneração axônica ou centrípeta. Com a perda do contato com o axônio devido ao evento traumático, células de Schwann proliferam e, num processo coordenado que envolve macrófagos, iniciam a degradação e a fagocitose dos debris de mielina deixando o tubo endoneural vazio e preparado para receber o axoplasma que será produzido pelo corpo celular durante o processo regenerativo. Estas células desempenham um papel fundamental na eliminação destas substâncias inibitórias e na criação de um

microambiente favorável à regeneração (STOLL & MULLER, 1999; HUBER *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2008).

Após este processo fagocítico, as células de Schwann proliferam sobre a membrana basal do tubo endoneural da extremidade distal da lesão e formam colunas denominadas bandas de Bungner, dando origem a um ambiente permissivo ao crescimento axonal (BUNGE; WILLIAMS; WOOD, 1982). A interação entre células de Schwann, lâmina basal e os novos axônios é mediada por uma série de moléculas de adesão, como caderinas, integrinas e imunoglobulinas e, num processo regenerativo satisfatório, as células de Schwann recuperam o contato com o axônio e se diferenciam novamente em células mielinizadas (**figura 5**) (JESSEN & MIRSKY, 2008; ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012).

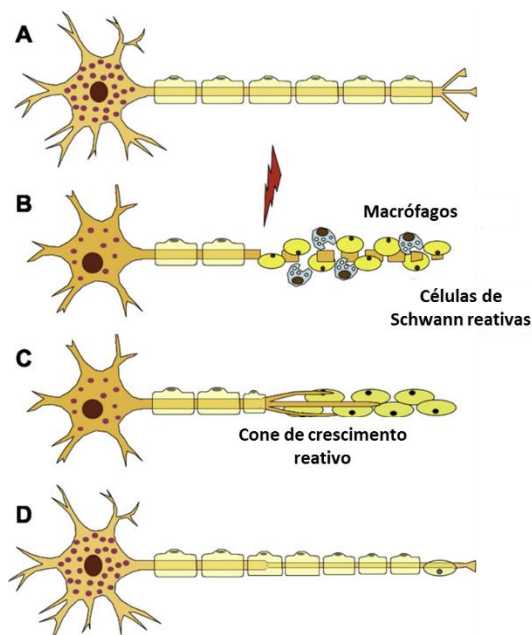


Figura 5. Degeneração e regeneração após a lesão do nervo. (a) Neurônio normal e fibra; (b) degeneração Walleriana; (c) Células de Schwann no segmento distal organizam-se em bandas de Bungner e (d) Reconexão axonal e remielinização e regeneração da fibra nervosa (adaptado de ALLODI; UDINA; NAVARRO, 2012).

A regeneração do nervo seccionado envolve a alteração do axônio lesionado em uma extremidade móvel denominada cone de crescimento. Esta extremidade é sensível ao ambiente circunjacente e promove o correto direcionamento do axônio em crescimento para o órgão alvo (SKENE *et al.*, 1986). A orientação da extremidade em crescimento é guiada por um gradiente de fatores neurotróficos e quimiotáticos, como o fator de crescimento do nervo (*nerve growth factor, NGF*), que são produzidos principalmente por células de Schwann, células não neuronais e pelo próprio órgão desnervado (RANKIN, 2008). Estas substâncias interagem com receptores específicos localizados na superfície do cone de crescimento. A ativação destes receptores inicia uma série de eventos citoplasmáticos necessários à reorganização do citoesqueleto associada à orientação da extensão axonal (FUJITANI *et al.*, 2005).

Inicialmente, cada cone de crescimento pode gerar dez ou mais protuberâncias denominadas filopodios. Quando estas estruturas reinervam seus órgãos alvo, permanecem viáveis e aumentam em tamanho. Entretanto, quando o cone de crescimento não alcança a extremidade distal, ele pode atrofiar e desaparecer, ou crescer de forma desorientada dentro de um estroma fibroblástico, denso e colagenoso, originando uma estrutura denominada neuroma, que está geralmente associada à dor e à disestesia. Por outro lado, quando a extremidade distal é alcançada, mas a reinervação não ocorre de forma específica em relação ao órgão ou à conexão alvo, a recuperação sensorial ou motora torna-se insatisfatória. Esta falta de especificidade é um dos principais agravantes para o restabelecimento das funções sensoriais e motoras nas lesões de nervos periféricos. Portanto, o correto direcionamento do crescimento axonal assume fundamental importância no processo regenerativo dos nervos e deve ser considerado à elaboração de abordagens terapêuticas (HORCH & LISNEY, 1981; SKENE, 1989; LUNDBORG *et al.*, 2004; MORTIMER *et al.*, 2008).

A gravidade e a extensão da lesão influenciam diretamente no sucesso do processo regenerativo. Em lesões brandas, quando as estruturas de tecido conjuntivo permanecem preservadas, servindo como guia, e apenas os axônios são lesionados, a recuperação funcional geralmente é satisfatória. Entretanto, em lesões severas, quando as estruturas de tecido conjuntivo estão comprometidas, pode ocorrer a formação de neuroma ou cicatriz glial e a recuperação é dificultada (BODINE-FOWLER *et al.*, 1997; MOLANDER & ALDSKOGIUS, 1992; VALERO-CABRE *et al.*, 2002; OH *et al.*, 2008).

Nestes casos, procedimentos microcirúrgicos são os tratamentos de escolha à reconstituição do nervo. Quando há secção do nervo sem perda

tecidual nem grande tensão, a microcirurgia pode ser realizada diretamente entre as extremidades proximal e distal do nervo. Porém, quando procedimentos cirúrgicos de restauração direta não são viáveis, ou quando há perda tecidual e descontinuidade anatômica, procedimentos como o transplante autóctone ou a neurotização são considerados os tratamentos de escolha. Entretanto, o transplante autólogo apresenta limitações como o tamanho do enxerto, a necessidade de procedimento cirúrgico para retirada do nervo, o comprometimento do local doador e a disponibilidade de tecidos. A neurotização, que consiste na anastomose de um nervo oriundo de uma raiz nervosa sadia com o coto distal do nervo lesionado, é limitada a lesões do plexo braquial. Além disso, lesões abaixo do cotovelo, que comprometem os movimentos dos punhos e dos dedos, dificilmente respondem à neurotização (ROHDE & WOLFE, 2007).

Como consequência dessas limitações, a utilização de dispositivos denominados guias de nervo, canais tubulares que promovem o ligamento entre as duas extremidades do nervo lesionado, e os envoltórios de nervos que dão suporte físico e protetor e promovem a regeneração, constituem uma alternativa ao transplante autólogo. Intensas pesquisas vêm sendo realizadas no aprimoramento destes dispositivos, que são considerados uma promissora alternativa à promoção da regeneração do tecido nervoso comprometido (LIAO *et al.*, 2013).

1.3 Guias e envoltórios para a regeneração de nervos

Os primeiros experimentos realizados com dispositivos aplicados à promoção da regeneração de nervos lesionados datam do século XIX. Van Lair relatou a utilização de um dispositivo constituído por um tubo de osso descalcificado utilizado como guia para o crescimento axonal de nervo ciático de cão que apresentava uma lesão de três centímetros entre as extremidades distal e proximal (VAN LAIR, 1882). Mais tarde, Von Bungner avaliou a utilização de veias e artérias no reparo de lesões de nervos (VON BUNGNER, 1891). Chiu e colaboradores (1982) deram início a uma série de estudos que sugeriram uma relativa eficácia da utilização de vasos sanguíneos, ou destes associados a tecido nervoso ou muscular, como guias para a regeneração de nervos (CHIU *et al.*, 1982; BRUNELLI *et al.*, 1993; TANG, 1995). Entretanto, Khouri e colaboradores demonstraram uma importante desvantagem nesta abordagem devido ao desenvolvimento de processo inflamatório e fibrose (KHOURI *et al.*, 1989). Guias de nervos constituídos de materiais como gelatina, ágar e borracha também foram avaliados, porém, sem

reconhecimento de benefício clínico (HUDSON; EVANS; SCHMIDT, 2000; IJPM; VAN DE GRAAF; MEEK, 2008).

A utilização de guias de nervo de silicone demonstrou eficácia similar a técnicas microcirúrgicas convencionais ao reparo de lesões de nervos de 3 a 4 milímetros em humanos (LUNDBORG *et al.*, 1997). Apesar destes resultados, algumas complicações como a compressão do nervo, danos relacionados à remoção do implante, reações inflamatórias e fibrose associadas ao uso de dispositivos de silicone foram relatadas (MERLE *et al.*, 1989).

Desde a avaliação dos dispositivos de silicone (WILLIAMS *et al.*, 1983), o desenvolvimento de guias e envoltórios protetores de nervos tem evoluído e, atualmente, estes materiais são a alternativa de escolha quando procedimentos cirúrgicos ou a substituição autóloga não são possíveis. Uma série de guias e envoltórios protetores de nervo receberam aprovação da agência reguladora americana *Food and Drug Administration* (FDA) e, atualmente, estão disponíveis para utilização clínica.

No período de 1999 a 2010, foram aprovados pelo FDA 11 dispositivos para o tratamento de lesões de nervos. Destes, sete correspondem a guias tubulares e quatro a envoltórios protetores. Polímeros naturais ou sintéticos são empregados na composição destes materiais. Os guias *NeuraGen*®, *Neuroflex*® e *NeuroMatrix*® e os envoltórios *NeuraWrap*® e *Neuromend*® são constituídos de colágeno tipo I. O guia e envoltório *Axoguard*® é constituído de submucosa intestinal de porco. Dentre os dispositivos constituídos de polímeros sintéticos enquadram-se os guias *Neurotube*® (ácido poliglicólico), *Neurolac*® (poli(DL-ácido láctico-ε-caprolactona)), policaprolactona e *Salutunel*® (álcool polivinílico) e o envoltório *Salubridge*® (álcool polivinílico). Dentre os dispositivos citados, todos são bioabsorvíveis, com exceção dos constituídos de álcool polivinílico. Estes materiais apresentam diferentes características em relação ao tempo de degradação (de 3 a 48 meses), ao diâmetro (de 1,5 a 10 mm) e ao comprimento (de 2 até 6,35 cm), e são aplicados de acordo com a extensão da lesão e o tamanho do nervo afetado (DALY *et al.*, 2012; KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

De maneira geral, dentre as vantagens da aplicação dos guias de nervos, destacam-se a limitação da infiltração de miofibroblastos no local da lesão, redução da cicatriz glial e de neuroma, redução do espalhamento colateral de neuritos e facilitação do acúmulo de fatores neurotróficos, além de permitir uma relativa orientação ao crescimento do nervo. Similar aos guias de nervo, os envoltórios têm o propósito de fornecer uma

barreira de proteção e evitar a formação de neuromas em nervos lesionados por secção ou esmagamento. Estes dispositivos possuem a vantagem de não causar constrição do nervo, minimizar o desenvolvimento de cicatriz glial e de criar um ambiente favorável à regeneração (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012). Entretanto, apesar dos avanços alcançados nas últimas décadas, a utilização destes materiais ainda é limitada a secções de, no máximo, quatro centímetros e em alguns casos não proporciona uma recuperação funcional satisfatória (DE RUITER *et al.*, 2009).

Polímeros naturais e sintéticos encontram alta aplicabilidade ao desenvolvimento de materiais médicos e apresentam vantagens e desvantagens inerentes à sua origem e composição química. Algumas características dos principais polímeros utilizados à confecção dos guias de nervos atualmente aprovados para uso humano serão discutidas a seguir.

O álcool polivinílico é um biomaterial sintético, hidrofílico e não absorvível. A sua hidrofiliçidade permite a incorporação de água em proporções similares aos tecidos, além de fornecer uma estrutura estável e fácil esterilização. Entretanto, devido à sua não biodegradabilidade, pode ocorrer tensão ou compressão do tecido nervoso após o processo regenerativo havendo a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para a retirada do dispositivo (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

Os polímeros reabsorvíveis podem ser de origem natural ou sintética. No primeiro caso, destaca-se o colágeno tipo I. Como principal componente da matriz extracelular, este polímero apresenta excelente biocompatibilidade, baixa antigenicidade e suas propriedades adesivas possibilitam uma boa adesão celular, promovendo a sua viabilidade e proliferação (AHMED *et al.*, 2005; STANG *et al.*, 2005). Estudos pré-clínicos avaliaram a segurança e a eficácia de materiais constituídos de colágeno tipo I. A utilização do guia *NeuraGen*® em ratos e primatas não humanos como modelos de lesão de nervos apresentou uma recuperação semelhante à sutura direta e ao transplante autólogo (ARCHIBALD *et al.*, 1991). Em outro estudo, a utilização do dispositivo diminuiu de 88% para 13% o desenvolvimento de autofagia, utilizando animais neurotomizados como controle (TYNER *et al.*, 2007).

Estudos clínicos avaliaram a segurança e a eficácia do guia de nervos *NeuraGen*®. Em um estudo realizado por Taras e colaboradores, foram avaliados 73 casos e em nenhum foi observada rejeição, sendo que em apenas dois houve formação de cicatriz glial (TARAS *et al.*, 2005). Em estudo posterior, realizado entre 2002 e 2007 com o mesmo

dispositivo, houve melhora em 35% dos casos avaliados por testes quantitativos (eletromiografia) e 45 % dos casos avaliados por testes qualitativos (relatos subjetivos e objetivos da função motora ou sensorial). Tais estudos sugerem a segurança e a eficácia do dispositivo *NeuraGen*® (WANGENSTEEN & KALLIAINEN, 2009). Em 2010, um estudo clínico multicêntrico realizado em 32 pacientes avaliados rotineiramente num período pós-operatório de 2 anos, mostrou que pacientes que receberam *NeuraGen*® apresentaram menor dor em relação aos pacientes tratados por procedimentos de reparo microcirúrgicos. Neste estudo foram avaliadas as funções sensoriais e motoras por técnicas de eletrofisiologia. O estudo concluiu que o dispositivo apresenta eficácia equivalente de reparo de nervos por procedimentos microcirúrgicos. *NeuraGen*® recebeu aprovação do FDA em 2001 e seu tempo de absorção é de aproximadamente 48 meses (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

Neuroflex® é um dispositivo semipermeável (com porosidade entre 0,1 e 0,5 μm), constituído de colágeno altamente purificado, sendo o único disponível comercialmente flexível e resistente à torção. Recebeu aprovação do FDA em 2001 e seu tempo de absorção varia de 4 a 8 meses (MEEK & COERT, 2008).

O envoltório *NeuroWrap*®, aprovado em 2004, apresenta composição química idêntica ao *NeuraGen*®. Possui uma membrana externa porosa que permite o fluxo de nutrientes e resiste à compressão dos tecidos externos, além de evitar a formação de cicatriz glial. Seu período de reabsorção é de 4 a 8 meses. *NeuroMend*® foi aprovado para uso clínico em 2006 e é um envoltório de composição e características semelhantes ao *NeuroWrap*®. Apesar de ambos dispositivos estarem disponíveis para uso clínico, poucos estudos foram conduzidos para comprovar a eficácia destes materiais (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

O colágeno tipo I apresenta as vantagens de ser um biopolímero abundante, facilmente isolado e purificado, favorável à manutenção da viabilidade e à proliferação celular e, portanto, apresenta excelente biocompatibilidade. Estudos pré-clínicos e clínicos demonstram a eficácia de guias de nervos constituídos deste material em lesões de até 20 milímetros em humanos. Por outro lado, o elevado tempo de degradação de dispositivos de colágeno tipo I, como o *NeuraGen*® (48 meses), pode causar compressão do nervo, dificultando a regeneração. O desenvolvimento de reações imunogênicas com a necessidade da utilização de drogas imunossupressoras e a variabilidade lote a lote destes biopolímeros são consideradas suas principais desvantagens (HUDSON; LIU; SCHMIDT, 2004).

Dentre os polímeros reabsorvíveis de origem sintética aplicados em guias de nervos enquadram-se o ácido poliglicólico e o copolímero poli(DL-lático- ϵ -caprolactona). O ácido poliglicólico é um poliéster alifático com ótimas propriedades mecânicas. Seu tempo de degradação no organismo é de 6 a 12 meses e ocorre através da hidrólise não específica de ligações éster. Sua degradação envolve a ação celular e a liberação de enzimas, gerando como produtos piruvato e glicolato (SCHLOSSHAUER *et al.*, 2006). *Neurotube*[®] foi o primeiro guia de nervos aprovado pelo FDA no ano de 1999. Este dispositivo é constituído de ácido poliglicólico, apresenta alta porosidade, favorecendo a formação de um ambiente rico em oxigênio, é flexível e resistente à tensão do tecido subjacente ao nervo lesionado, além de ser bioabsorvível. Estes dispositivos são indicados para lesões de até 3 centímetros. Em um estudo pré-clínico, a utilização do guia de ácido poliglicólico *Neurotube*[®] apresentou uma baixa recuperação funcional, além do dispositivo colapsar 12 meses após o implante, enquanto que os guias *Neuragen*[®] e *Neurolac*[®] permaneceram estruturalmente estáveis no mesmo período (SHIN *et al.*, 2009). Além disso, o crescimento axonal apresentou-se menos organizado quando comparado aos guias de colágeno e com o transplante autólogo (DELLON & MACKINNON, 1988). Em estudo clínico realizado com *Neurotube*[®], foram avaliados 15 pacientes, dos quais 33% apresentaram excelentes resultados, 53% bons resultados e 14% resultados insatisfatórios (MACKINNON & DELLON, 1990). De forma similar, em estudo clínico multicentro, 136 intervenções foram avaliadas. Após 1 ano, resultados excelentes (44%) e bons (30%) foram obtidos nas intervenções que utilizaram *Neurotube*[®]. Comparativamente, as intervenções com anastomose (lesões inferiores a 8 mm) ou transplante autólogo (lesões superiores a 8 mm) apresentaram resultados excelentes ou bons para 43% do total de casos avaliados (WEBER *et al.*, 2000). Além destes, uma série de outros estudos clínicos sugerem que a utilização deste dispositivo promove uma recuperação sensorial e motora satisfatória, além da sua utilização ser favorável ao transplante autólogo devido a problemas relacionados com diferenças entre o diâmetro e características do enxerto e da morbidade do local doador (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

As principais vantagens do *Neurotube*[®] são sua excelente biodegradabilidade, aderência celular e propriedades mecânicas iniciais. Apresenta o maior número de estudos em comparação aos outros guias de nervos aprovados para uso humano, o que evidencia a sua segurança, além de uma eficácia equivalente aos procedimentos microcirúrgicos e de transplante autólogo. Entretanto, sua alta taxa de degradabilidade

compromete suas propriedades mecânicas em relativo curto período de tempo e a acidez dos produtos de degradação são seus principais limitantes (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

O copolímero sintético poli(DL-lático-ε-caprolactona), fabricado a partir da copolimerização do ácido lático com policaprolactona, é um poliéster hidrofóbico e bioabsorvível constituente do guia de nervos *Neurolac*®. Este dispositivo ganhou aprovação do FDA em 2003 e é o único guia de nervos transparente atualmente disponível para uso humano (NAIR & LAURENCIN, 2007). O polímero policaprolactona vem sendo amplamente estudado devido ao seu baixo custo e fácil obtenção. Sua biodegradabilidade ocorre por hidrólise enzimática, de forma similar ao ácido polilático. Entretanto, sua taxa de degradação é consideravelmente menor. Os subprodutos formados são os ácidos succínico, butírico, valérico e capróico, compostos atóxicos que não causam resposta inflamatória. Estes subprodutos são menos ácidos em relação aos subprodutos gerados pela biodegradação do ácido lático e, conseqüentemente, causam menos danos aos tecidos (WOODRUFF & HUTMACHER, 2010). A copolimerização com ácido polilático melhora suas características mecânicas como cristalinidade e maleabilidade, além de aumentar a sua taxa de degradação (STANG *et al.*, 2009).

Estudos pré-clínicos realizados com *Neurolac*® relatam a ocorrência de um processo regenerativo satisfatório, dois anos após o implante, apesar da existência de fragmentos de biomaterial com presença de células gigantes multinucleadas, macrófagos e reações de corpo estranho (JANSEN *et al.*, 2004; MEEK & JANSEN, 2009). Por outro lado, um estudo clínico realizado com 30 pacientes ao longo de um ano, sugere que este dispositivo tem uma eficácia equivalente ao transplante autóctone (MEEK, 2005). A transparência do guia de nervos *Neurolac*® apresenta vantagens operatórias, ainda que a rigidez do biomaterial e a resposta inflamatória sejam seus principais fatores limitantes (KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

Apesar dos avanços relatados desde a aprovação dos primeiros guias de nervos, o uso destes dispositivos restringe-se à lesões de, no máximo, quatro centímetros, com uma baixa incidência de recuperação sensorial e motora satisfatórias. Para superar estas limitações, diversas abordagens vêm sendo investigadas ao desenvolvimento de uma nova geração de guias de nervos que promovam uma regeneração mais rápida e com maior número e comprimento axonal. Nesse contexto, algumas características fundamentais devem ser observadas como, por exemplo, a utilização de materiais com satisfatórias biocompatibilidade e biodegradabilidade, adequadas propriedades físico-químicas e estruturais

(e.g., resistência, flexibilidade e porosidade), que permitam a difusão de nutrientes ao interior do dispositivo e de produtos metabólicos para o exterior e, simultaneamente, forneça suporte ao crescimento dos axônios sem o desencadeamento de respostas inflamatórias (DE RUITER *et al.*, 2009). Outros conceitos importantes que devem ser observados na idealização destes dispositivos incluem o fornecimento de fatores neurotróficos e quimiotáticos à promoção do correto direcionamento das projeções axonais no sentido do seu órgão alvo. Adicionalmente, requisitos técnicos relacionados à produção, esterilização e aos procedimentos cirúrgicos deverão ser observados (ARSLANTUNALI *et al.*, 2014; KEHOE; ZHANG; BOYD, 2012).

A obtenção de modernos sistemas poliméricos através da utilização da nanotecnologia tem possibilitado o desenvolvimento de estruturas (*scaffolds*) biointegradas contendo substâncias bioativas e com uma arquitetura favorável à promoção da diferenciação, crescimento celular e regeneração tecidual.

Nesse contexto, através da utilização técnica de eletrofiação (*electrospinning*) é possível produzir matrizes poliméricas com fibras de dimensões nanométricas, além de incorporar substâncias bioativas como, por exemplo, fatores neurotróficos, produzindo, dessa forma, um sistema nanoestruturado de liberação prolongada à promoção do crescimento e da diferenciação celular.

1.4 Materiais produzidos por eletrofiação para aplicação em lesões de tecidos nervosos

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial de nanofibras poliméricas produzidas por eletrofiação para a regeneração de tecidos nervosos periféricos. O alinhamento das fibras e a incorporação de substâncias bioativas nas matrizes estão entre as principais abordagens empregadas ao desenvolvimento de novos biomateriais aplicados à regeneração de nervos. Diferentes métodos foram descritos na tentativa de produzir fibras alinhadas, que apresentem uma variação angular mínima. Entretanto, o alinhamento das fibras é dificultado por forças externas que atuam no campo elétrico e geram instabilidades que causam um movimento caótico no curso do jato da solução polimérica e que são inerentes ao processo de *electrospinning* (RENEKER *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2012).

A morfologia e o alinhamento das fibras podem ser influenciados por parâmetros processuais como a voltagem aplicada à geração do campo elétrico, a distância entre a agulha e o coletor (distância de

trabalho), o fluxo e as características da solução polimérica. Entretanto, as características do sistema coletor constituem a variável de maior influência no alinhamento e arquitetura das fibras (LI; WANG; XIA, 2003; SAHAY *et al.*, 2011).

A utilização de um sistema coletor que utiliza um cilindro giratório com alta rotação (1000 rpm) possibilita a obtenção de fibras alinhadas com potencial aplicação em engenharia de tecidos (XUA *et al.*, 2003). Utilizando um sistema coletor similar, Yang e colaboradores produziram nano e microfibras alinhadas de ácido polilático (PLA) e demonstraram que as nanofibras promovem uma maior diferenciação de células tronco neuronais de camundongos em relação às microfibras. Não foram observadas diferenças em relação ao direcionamento celular entre nano e microfibras. Além disso, o crescimento dos neuritos ocorreu paralelamente às fibras, o que sugere que a arquitetura destes materiais influencia na morfologia e diferenciação celular (YANG *et al.*, 2005).

Chew e colaboradores utilizaram um cilindro giratório a 2200 rpm para obtenção de nano e microfibras alinhadas, constituídas por um copolímero de etil-etileno fosfato e policaprolactona. Este sistema permitiu a incorporação de NGF, no entanto, com prejuízos ao alinhamento das fibras e a manutenção satisfatória da bioatividade deste fator neurotrófico ao longo tempo (CHEW *et al.*, 2005). Em outro estudo, utilizando células de Schwann, o mesmo grupo demonstrou que matrizes constituídas de fibras alinhadas ou randomizadas de PCL aumentam a expressão da glicoproteína associada à mielina (*Myelin associates glycoprotein*, MAG), e diminuem a expressão de NCAM-1, um marcador de células de Schwann imaturas. Adicionalmente, detectou-se um aumento da expressão do gene *P0*, específico para mielina, apenas em células Schwann cultivadas sobre matrizes de fibras alinhadas. Estes resultados sugerem que o alinhamento das nanofibras pode promover a maturação de células de Schwann (CHEW *et al.*, 2008). Yao e colaboradores (2009) compararam a taxa de proliferação celular e o tamanho dos neuritos de células PC 12 inoculadas em nanofibras de PCL randomizadas ou alinhadas. Os resultados deste estudo demonstraram que o alinhamento das nanofibras promoveu uma maior proliferação celular e prolongamento de neuritos em relação às nanofibras randomizadas (YAO *et al.*, 2009). A utilização de estruturas de nanofibras de ácido polilático (PLA) para o cultivo de células neuronais motoras e sensoriais mostrou-se positiva ao crescimento e diferenciação destas células em relação a filmes do mesmo material (GERTZ *et al.*, 2010).

O efeito biológico de materiais nanofibrosos também foi avaliada por Xia e colaboradores (2014), através de estudos de co-cultura com

células do gânglio da raiz dorsal (*dorsal root ganglion*, DRG) e células de Schwann sobre nanofibras randomizadas ou alinhadas de polimetilmetacrilato, ou sobre filme deste polímero. Células do DRG emitiram neuritos mais longos quando cultivadas sobre matrizes com nanofibras alinhadas. Além disso, os neuritos cresceram de forma alinhada e paralelamente a estas nanofibras, com maior co-localização entre os neuritos e as células de Schwann (XIA *et al.*, 2014).

Wang e colaboradores (2010) exploraram a influência do diâmetro de nanofibras alinhadas de PLA no crescimento de neuritos de células do DRG e na migração de células de Schwann. Através da variação do sistema de solventes, os autores produziram três matrizes de nanofibras alinhadas com diâmetros médios de 293 ± 65 nm, 759 ± 179 nm e 1325 ± 383 nm. O crescimento dos neuritos e a migração das células de Schwann ocorreram de forma orientada ao longo das fibras alinhadas. O diâmetro das fibras influenciou significativamente a morfologia das células do gânglio da raiz dorsal e a migração das células de Schwann, enquanto neuritos mais longos foram observados em células cultivadas sobre fibras com maior diâmetro. Por outro lado, não foi observada uma correlação entre a migração das células de Schwann e o diâmetro das fibras. Estes resultados sugerem que o diâmetro das fibras influencia significativamente no comportamento celular e deve ser considerado no desenvolvimento de guias de nervos (WANG *et al.*, 2010).

Em um estudo realizado por Neal e colaboradores (2012), nanofibras randomizadas e alinhadas constituídas de policaprolactona e laminina foram desenvolvidas e avaliadas *in vitro* e *in vivo*. Guias de nervos com e sem a presença de nanofibras contendo laminina no lúmen também foram avaliadas neste estudo. O alinhamento e a presença de nanofibras no lúmen do dispositivo demonstraram eficácia superior em relação aos dispositivos constituídos de nanofibras randomizadas e dos dispositivos ociosos. Este trabalho sugere que a combinação de materiais naturais e sintéticos é uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos guias de nervos (NEAL *et al.*, 2012).

Matrizes constituídas de nanofibras randomizadas e alinhadas de polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV) e colágeno foram produzidas e avaliadas por Prabhakaran e colaboradores (2013). Estes autores demonstraram que o alinhamento destas fibras pode direcionar a orientação de neuritos de células PC 12 e o aumento da proporção de colágeno nas fibras estimulou a proliferação celular (PRABHAKARAN *et al.*, 2013).

Além da avaliação da arquitetura e da morfologia de estruturas nanofibrosas para a regeneração de nervos, a incorporação de substâncias

bioativas, em especial fatores neurotróficos, constitui uma das principais abordagens à obtenção de novos biomateriais para a regeneração tecidual. Nesse sentido, a técnica de *electrospinning* constitui uma importante tecnologia ao desenvolvimento de sistemas de liberação prolongada destas substâncias. Entretanto, a incorporação destes peptídeos neurotróficos às nanofibras, o controle da liberação no local da lesão e a manutenção da bioatividade ao longo do processo regenerativo constituem desafios ao desenvolvimento destes sistemas. Este contexto geralmente relaciona-se à utilização de solventes orgânicos que causam a desnaturação do peptídeo, comprometendo sua bioatividade, além da dificuldade de promover uma liberação controlada ao longo do tempo e estabilizar a proteína na estrutura nanofibrosa. Para superar estes desafios, diversas abordagens vêm sendo exploradas na tentativa de desenvolver sistemas eficazes de liberação destes fatores. Algumas destas abordagens serão apresentadas e discutidas a seguir.

A utilização de um sistema coaxial de *electrospinning* que utiliza duas soluções para obtenção de fibras constituídas por duas camadas foi descrita por Liu e colaboradores (2011) para obtenção de um guia de nervos constituído por nanofibras do copolímero de ácido polilático-co-policaprolactona (50:50), contendo no interior das fibras albumina e NGF. Este dispositivo foi comparado com um guia similar, porém, sem a presença de NGF no interior das nanofibras; com um guia similar sem NGF e com a administração local deste peptídeo e com o transplante autóctone. Para a avaliação da eficácia destes biomateriais utilizou-se um modelo de secção de nervo ciático de rato. Parâmetros funcionais e histológicos foram avaliados 12 semanas após o procedimento cirúrgico. Os resultados demonstraram que o dispositivo contendo NGF no seu interior apresentou eficácia semelhante ao transplante autóctone e foi significativamente superior aos outros dispositivos avaliados. No entanto, a eficácia de encapsulação do NGF e a manutenção da sua bioatividade não foram relatadas (LIU *et al.*, 2011).

Kuihua e colaboradores utilizaram um sistema semelhante de *electrospinning* coaxial para obtenção de nanofibras alinhadas constituídas de seda e do copolímero ácido polilático-co-policaprolactona e de uma camada interna contendo NGF. As nanofibras foram produzidas utilizando como sistema coletor um cilindro giratório, operando a 4000 rpm. A liberação do NGF foi avaliada através de bioensaios utilizando células PC 12, em imunoensaio para a quantificação do NGF ao longo do tempo. Os materiais foram avaliados por um período de 60 dias e os resultados demonstraram a manutenção da liberação e da bioatividade do NGF no período estudado. Todavia, a quantidade de liberação cumulativa

do fator de crescimento ao longo do período experimental foi baixa e, portanto, a porcentagem de células diferenciadas, cultivadas em presença do sobrenadante do biomaterial, foi inferior ao controle (KUIHUA *et al.*, 2013).

A manutenção da bioatividade de fatores neurotróficos como o NGF em sistemas de liberação prolongada, especialmente em biomateriais nanofibrosos, constitui um desafio ao desenvolvimento de novos guias à regeneração de nervos periféricos. A utilização de solventes orgânicos para a dissolução dos polímeros utilizados nestes dispositivos, as condições processuais e a sensibilidade dos peptídeos dificultam a conservação da sua estrutura o que acarreta, geralmente, na perda da sua bioatividade. Uma alternativa a este problema é a estabilização da molécula de NGF com polímeros hidrofílicos como pré-tratamento ao processo de produção de sistemas de liberação prolongado.

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero hidrossolúvel aprovado para uso parenteral humano. A utilização de PEG para encapsular proteínas em micropartículas de ácido poliglicólico polilático (PLGA) foi proposta por Morita e colaboradores (2001). Estes autores liofilizaram uma solução aquosa de gelatina e PEG previamente à mistura à solução orgânica de PLGA para a obtenção de micropartículas (MORITA *et al.*, 2001). Posteriormente, uma metodologia similar foi proposta por Johnson e colaboradores (2008) para estabilizar NGF em discos de PLGA de 0,1 cm de espessura. Uma solução aquosa de NGF e PEG foi liofilizada e adicionada ao PLGA em diclorometano. Os discos foram obtidos por dissolução, seguida de evaporação, e a bioatividade foi determinada via quantificação da diferenciação de células PC 12 e de NGF através de imunoensaio, 24 h após o encapsulamento. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia desta técnica à manutenção da bioatividade do NGF, ainda que a bioatividade do NGF após o período de 24 h não tenha sido avaliada (JOHNSON *et al.*, 2008). A estabilização do NGF pelo PEG parece estar relacionada à diminuição da superfície de contato do peptídeo com o solvente orgânico (PEAN *et al.*, 1999).

Além da estabilização de proteínas, o PEG apresenta propriedades porogênicas e pode ser usado para aumentar a biodegradabilidade de polímeros. A porosidade influencia na viabilidade e proliferação celular, deposição de componentes da matriz extracelular, difusão de células, nutrientes, oxigênio e produtos de degradação e, portanto, é um fator determinante a ser considerado no desenvolvimento de biomaterias (KARANDE; ONG; AGRAWAL, 2004; ZELTINGER *et al.*, 2001; NARAYAN & VENKATRAMAN, 2008). Columbus e colaboradores avaliaram a influência de PEG, com pesos moleculares de 3400 e 8000,

na formação de poros em biomaterias de PCL. Os materiais constituídos por PCL: PEG (3400) (1: 1, m:m) apresentaram poros com diâmetro entre 14 e 24 μm (78%) com uma distribuição mais uniforme em relação ao PCL: PEG (8000 kDa). Uma diminuição no tempo de degradação dos biomateriais também foi relatada neste estudo (KRISHNAN; KRISHNAN; COLUMBUS, 2014).

Outra propriedade importante do PEG foi descoberta por Bittner e colaboradores (1990), os quais demonstraram que este polímero apresenta bioatividade na promoção da regeneração de tecidos nervosos e promove a reconexão de axônios lesionados através da fusão de seus plasmalemas (BITTNER *et al.*, 1986; KRAUSE & BITTNER, 1990). Este efeito também foi observado em lesões de medula espinhal em axônios mielinizados (BORGENS & SHI, 1990; STAVISKYA *et al.*, 2005).

1.5 Aplicação da PCL em medicina

PCL é um poliéster hidrofóbico obtido a partir da polimerização da ϵ -caprolactona (VAN NATTA; HILL; CARRUTHERS, 1934). Este polímero é bioabsorvível e biocompatível, possui baixo ponto de fusão (59-64 $^{\circ}\text{C}$) e boa compatibilidade com outros polímeros (NAIR & LAURECIN, 2007). A PCL é aprovada pelas principais agências reguladoras mundiais, incluindo a FDA (*Food and Drug Administration*) e a EMEA (*European Medicines Agency*), para uso em medicina humana. Dessa forma, é aplicada em uma ampla gama de produtos, incluindo fios de sutura bioabsorvíveis (MIDDLETON & TIPTON, 2000), implantes subcutâneos contraceptivos (SUN *et al.*, 2006), filmes para prevenção de adesão tecidual pós-operatória (KLOPP, 2008), materiais odontológicos (MINER; BERZINS; BAHCALL, 2006), guias de nervos (NAIR & LAURENCIN, 2007) sistemas de liberação de fármacos (SINHA *et al.*, 2004) e *scaffolds* em engenharia de tecido (MONDAL; GRIFFITH; VENKATRAMAN, 2016).

O tempo de degradação do homopolímero de PLC no corpo humano é de 2 a 4 anos, dependendo do peso molecular do polímero, que pode variar de 3.000 a 80.000 Da (BOSTMAN *et al.*, 1990; HAYASHI, 1994). Este processo envolve, numa primeira etapa, a clivagem hidrolítica não enzimática de grupamentos ésteres, causando a fragmentação da superfície por erosão. Posteriormente, quando o peso molecular do polímero se torna inferior a 3.000 Da, estes fragmentos são fagocitados por macrófagos, células gigantes e fibroblastos e uma vez no fagossomo,

os fragmentos de PCL de baixo peso molecular são hidrolisados à ácido 6-hidroxil capróico e acetil coenzima A, que entram no ciclo do ácido cítrico para completa eliminação do organismo (PITT *et al.*, 1981; WOODWARD *et al.*, 1985; SUN *et al.*, 2006).

Apesar dos polímeros bioabsorvíveis apresentarem boa biocompatibilidade, a lixiviação de impurezas e substâncias ácidas a partir destes materiais pode originar processos inflamatórios. Entretanto, em relação a outros poliésteres biodegradáveis, como o ácido polilático e o poliglicólico, a liberação de compostos ácidos a partir da PCL é de menor importância. A velocidade de eliminação dos subprodutos dos biomateriais depende das características do tecido no local do implante, como vascularização e atividade metabólica, e também da taxa de degradação do polímero (LAM *et al.*, 2008).

Devido à boa biocompatibilidade, à capacidade de ser totalmente bioabsorvida pelo organismo e à alta permeabilidade à fármacos, a PCL tem sido amplamente empregada em sistemas de liberação prolongada de substâncias terapêuticas, incluindo peptídeos e proteínas. A taxa de liberação destes compostos depende de fatores como quantidade e característica da substância incorporada, composição da formulação e processo de obtenção. Estes sistemas podem ser constituídos de microesferas ou nanoesferas, micro ou nanocápsulas, dos quais diversos processos estão disponíveis para o preparo destas formas (SINHA *et al.*, 2004; FREIBERG & ZHU, 2004). A baixa taxa de biodegradação e a hidrofobicidade conferem à sistemas constituídos de PCL um longo período de liberação, superior a um ano. Entretanto, diferentes polímeros podem ser adicionados à PCL com o objetivo de melhorar a resistência à ruptura por tensão, aumentar a hidrofiliabilidade e as propriedades de adesão, ou adequar a taxa de biodegradação e a cinética de liberação de substâncias bioativas (CHANDRA & RUSTGI, 1998).

A PCL apresenta excelentes propriedades reológicas, o que permite a produção de *scaffolds* através de uma série de tecnologias como lixiviação, separação de fase, estereolitografia, sinterização a laser, impressão tridimensional, ES, entre outras. Os materiais obtidos através destas técnicas apresentam diversas características, vantagens e limitações que devem ser consideradas de acordo com a aplicação pretendida (LOH & CHOONG, 2013; MONDAL; GRIFFITH; VENKATRAMAN, 2016). Materiais constituídos de PCL produzidos por ES têm sido investigados como *scaffolds* para engenharia de tecidos ósseos (GUARINO *et al.*, 2008), tendões (KAZIMOGLU *et al.*, 2003), cartilaginosa (LI *et al.*, 2005), cardiovasculares (BALGUID *et al.*, 2009);

JEONG *et al.*, 2005), pele (POWELL & BOYCE, 2009) e nervo (MEEK *et al.*, 1999).

À vista disso, este trabalho propõe-se investigar a adequação do uso da tecnologia de ES para a obtenção de biomateriais nanofibrosos de PCL e PEG, visando avaliar o seu potencial como um sistema de liberação de NGF para aplicação em guia de nervos.

Como hipótese de trabalho, assume-se que um dispositivo de nanofibras alinhadas promove a liberação prolongada de fator de crescimento do nervo, influencia o alinhamento de neuritos e a diferenciação celular e apresentam potencial de aplicação em lesões de nervos periféricos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um dispositivo de nanofibras de PCL/PEG alinhadas que promova a liberação prolongada de NGF.

2.2 Objetivos específicos

- a. Desenvolver um sistema de ES para a produção de nanofibras poliméricas;
- b. Estudar a influência dos parâmetros envolvidos no processo de ES nas características de fibras de policaprolactona;
- c. Otimizar o processo de obtenção de micro- e nanofibras de PCL;
- d. Caracterizar os nanomateriais quanto à morfologia, diâmetro e alinhamento;
- e. Desenvolver estratégias configuracionais à obtenção de nanofibras alinhadas;
- f. Avaliar a influência do PEG em nanofibras de policaprolactona em relação à arquitetura, propriedades mecânicas e degradabilidade *in vitro*;
- g. Desenvolver um sistema de liberação prolongada de NGF constituído por uma bicamada de nanofibras com uma face interna alinhada e a face externa randomizada;
- h. Avaliar em ensaios de cultura celular (linhagens L929, PC12), a citotoxicidade e a influência do biomaterial na morfologia e diferenciação celular;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Policaprolactona 80 kDa, Polietilenoglicol 400 Da, 1500 Da e 35 kDa, clorofórmio, dimetilformamida, diclorometano, acetona e etanol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Fator de crescimento do nervo (NGF), Texas Red Phalloidin, 4', 6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), brometo de 3-(4, 5-dimetil tiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazólio (MTT), agarose, soros fetais bovino e equino e os meios de cultura RPMI e DMEM, HEPES, tripsina, EDTA e penicilina/streptomicina foram adquiridos da Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

3.2 Obtenção das matrizes poliméricas constituídas por micro e nanofibras

As matrizes poliméricas foram obtidas através de equipamento de *electrospinning* constituído por uma fonte de alta voltagem com amplitude de 0 a 30 kV (Spellman CZE 1000R), uma bomba de infusão (Harvard apparatus PHD 2000) e uma seringa com uma agulha metálica de 22 G (0,7 mm). Três sistemas coletores foram avaliados: um coletor constituído por um cilindro metálico de 20 cm de diâmetro com velocidade de rotação ajustável de 0 a 2000 rpm (a); um coletor de fios de cobre estático de 6 mm de diâmetro, espaçados paralelamente em 1 cm (b) e um sistema de mandril com 1,5 mm de diâmetro e velocidade de rotação ajustável de 0 a 2000 rpm (c) (**figura 6**).

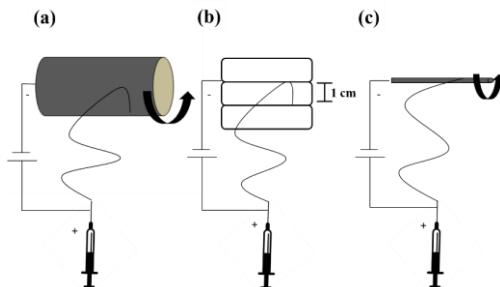


Figura 6. Representação esquemática dos sistemas coletores utilizados para a obtenção de nanofibras. (a) cilindro metálico com 20 cm de diâmetro e velocidade ajustável de 0 a 2000 rpm; (b) coletor estático de fios de cobre com 6 mm de diâmetro, dispostos paralelamente a 1 cm de distância e (c) mandril com 1,5 mm de diâmetro e velocidade de rotação ajustável entre 0 e 2000 rpm.

3.2.1 Obtenção das matrizes de micro e nanofibras de PCL e PCL/PEG

Para obtenção de nanofibras de PCL, inicialmente realizou-se um estudo de otimização de processo, aonde foi determinado o impacto das variáveis processuais nas características das fibras. O sistema de solventes, a concentração do polímero para obtenção da solução polimérica, o fluxo de infusão e as características do sistema coletor (velocidade de rotação e configuração) foram as variáveis analisadas, sendo estas descritas em detalhes na seção de resultados do trabalho. Todos os protocolos experimentais foram realizados à temperatura ambiente (20 - 30°C; 50 - 60% U.R.), com uma voltagem de 15 Kv e a distância entre a extremidade da agulha e o coletor de 10 cm.

Para obtenção das nanofibras de PCL/PEG, PCL (12 %, m/v) foi dissolvida em clorofórmio: etanol (7: 3, v: v) previamente à adição de PEG (MW 400, 1.500, ou 35.000 Da). PCL e três razões PCL/PEG foram avaliadas: 100: 1; 100: 5 e 100: 10 (m/m). Todos os protocolos experimentais foram realizados à temperatura ambiente (20 - 30°C; 50 - 60% U.R.) com os seguintes parâmetros processuais: Voltagem: 15 Kv, taxa de fluxo da solução polimérica: 1mL/h, distância entre agulha e coletor: 10 cm e velocidade do coletor cilíndrico: 200 rpm. Para a remoção de qualquer solvente residual, as matrizes permaneceram à 37±2° C por 24h, sob vácuo.

3.2.2. Obtenção do sistema de liberação de NGF

Para incorporar o NGF nas matrizes, 120 µL de uma solução mãe composta por NGF/BSA (1: 50, m/m), contendo 120 µg de NGF, foram adicionados a soluções aquosas contendo 120 mg de PEG. As soluções de NGF/BSA (controle) ou PEG/NGF/BSA foram liofilizadas e incorporadas à solução de PCL (12%, m/v) previamente dissolvido em clorofórmio: etanol (7: 3, v: v). Os sistemas foram mantidos sob agitação por 30 min e submetidos ao processo de *electrospinning*. A partir desta solução, foram obtidos dois sistemas de liberação: membranas com fibras randomizadas e um sistema tubular constituído por fibras alinhadas na face interna e fibras randomizadas no exterior. Os parâmetros aplicados estão descritos em detalhes na seção de resultados do trabalho.

3.3 Caracterização das matrizes

As características morfológicas das matrizes foram avaliadas através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (JEOL JSM-6390LV), à uma voltagem de aceleração de 10 kV. Para determinação do diâmetro médio das fibras e do seu alinhamento, 3 imagens (aumento de 1000x) foram avaliadas, sendo registradas 100 medições de 3 regiões diferentes por amostra, a partir de três experimentos independentes. A análise de distribuição do ângulo das fibras assumiu como referência o ângulo 0°. Estas análises foram realizadas através do *software* ImageJ (Image J 1.37c, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

3.4 Determinação das propriedades mecânicas das matrizes de PCL e PCL/PEG

As propriedades mecânicas foram avaliadas por testes de tração uniaxial, em analisador de textura (modelo TA.Hdi, Stable Micro Systems, England) equipado com garras fixas. Amostras com 70 mm de comprimento e 10 mm de largura foram montadas no equipamento usando fita adesiva. Para cada amostra, a espessura foi medida em diferentes regiões através de um micrometro digital (modelo MDC-25S, Mitutoyo Corp., Tokyo, Japan). A distância inicial de separação entre as garras foi fixada em 50 mm, com uma velocidade de 0,5 mm/s. O módulo de Young, resistência à tração e alongamento percentual foram determinados pela curva tensão-deformação obtidas a partir de ensaios de testes de tensão uniaxial até a ruptura das amostras. Todos os experimentos foram conduzidos à 20 °C (± 2 °C) /50% ($\pm 2\%$) U.R. Ao menos oito amostras de cada matriz foram testadas.

3.5 Estudos de cultura celular

Estudos *in vitro* utilizando modelos de culturas celulares foram realizados para a avaliação das nanomatrizes quanto à citotoxicidade, influência na morfologia celular e bioatividade de sistema de liberação de NGF. Os estudos de citotoxicidade foram realizados com linhagem de fibroblastos de camundongos (L929), cultivados em meio Eagle modificado por Dubbelco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de tampão HEPES, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 g/mL estreptomina. A influência das nanomatrizes na morfologia celular e a avaliação da bioatividade de sistema de liberação de NGF foram conduzidos com linhagem de

feocromocitoma da medula adrenal de ratos (PC12), cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 10 % de soro equino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 g/mL estreptomicina. Os meios foram substituídos a cada 48 h e todas as culturas foram mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% CO₂.

3.5.1 Citotoxicidade

A citotoxicidade indireta foi determinada expondo as matrizes a meio DMEM durante 24 h para extração de eventuais compostos tóxicos contido nas matrizes. Este meio DMEM foi denominado meio de extração. Fibroblastos L929 foram incubados a uma densidade de 5×10^3 células/poço, em placa de 96 poços (TCP, Techno Plastic Products). Após 24 h (período de adesão celular), o meio de cultura foi substituído pelo meio de extração e as células foram cultivadas por adicionais 48h, seguido da determinação da atividade metabólica celular via ensaio do brometo de 3-(4, 5-dimetil tiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazólio (MTT - MOSMANN, 1983). Para tal, 10 µl de uma solução de MTT (5,0 mg/mL) foram adicionados a 100 µL de meio DMEM (por poço), transferindo-se o conteúdo para placa de 96 poços contendo as células L929 e incubando-se por 3 h, à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados para dissolver os cristais intracelulares de formazan. A absorbância do meio de reação foi determinada a 540 nm, em leitor de placa (SpectraMax Paradigm; Molecular Devices, CA, USA). Meio de cultura DMEM fresco foi utilizado como controle. Os resultados foram expressos em porcentagem da absorbância em relação ao controle. Foram realizados três experimentos independentes, em sextuplicata (n=18).

3.5.2 Ensaio de difusão em gel de agarose (agarose *overlay*)

O ensaio de difusão em gel de agarose é utilizado para predição do potencial irritante de biomateriais. Para a realização deste ensaio, fibroblastos L929 foram inoculados em placas de 6 poços (2×10^6 células/poço) até confluência. O meio de cultura foi substituído por uma solução de agarose em DMEM (1.6% m/v). Após a geleificação da solução, matrizes de PCL ou PCL/PEG foram cortadas em discos de 6 mm de diâmetro e posicionadas centralmente sobre a agarose. A difusão de substâncias tóxicas provenientes de biomaterias causa morte celular e formação de um halo, visualizado após a exposição das células ao MTT. O diâmetro do halo é relacionado com o potencial citotóxico da

substância. Como controle positivo foram utilizados discos de 6 mm de celulose, previamente embebidos com 25 μ L de uma solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) (do Inglês, sodyum dodecyl sulfate) (10% m/v) por disco. Como controle negativo, discos de 6 mm de celulose sem a adição de SDS foram utilizados.

Após 24 h de cultura, os discos foram retirados e 2 mL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado a cada poço. As culturas foram mantidas à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 4 horas. Os cultivos foram observados macroscopicamente para determinar a formação de regiões descoloridas, correspondentes à ausência de atividade mitocondrial. Análise microscópica foi realizada para determinar mudanças morfológicas para avaliação de zonas de lise celular causada por cada material em relação à classificação de toxicidade do detergente SDS, baseado no teste de irritação de Draize, como previamente descrito (O'BRIEN, JONES, ROCKLEY, 1990). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas de três experimentos independentes.

3.5.3 Influência da arquitetura das matrizes na morfologia celular

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de fluorescência foram usadas no estudo da influência da arquitetura das nanomatrizes na morfologia celular. Linhagens de células PC12 foram inoculadas em placas de 24 poços sobre as nanomatrizes previamente esterilizadas através de exposição à radiação UV, e incubadas à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Amostras dos cultivos celulares foram coletadas 7 dias após a incubação. Para análise por MEV, as células foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) em PBS, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%, v/v) e secas em cabine de segurança, à temperatura ambiente durante 12 h. Amostras foram fixadas com fita adesiva de carbono em suportes de alumínio (*stubs*) e recobertas com ouro (metalização), previamente à visualização em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV), operando com voltagem de aceleração de elétrons de 10 kV. Para as análises de microscopia de fluorescência, as células foram fixadas com paraformaldeído a 3,7% (v/v) em PBS. Filamentos de actina foram marcados com Alexafluor 546, conjugado com faloidina (A22283, Invitrogen). O DNA foi marcado com 1 mg/mL de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). As amostras foram montadas em lamínulas para microscopia e analisadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus BX41).

3.5.4 Bioatividade do NGF incorporado ao sistema de liberação

Para avaliar a bioatividade do NGF ao longo do tempo, nanomatrizes foram cuidadosamente pesadas e transferidas para frascos de cultura contendo meio RPMI, na proporção de 10 mg de matriz para cada 1 mL de meio de cultura (meio extrator). O meio extrator foi substituído periodicamente (6h, 1d, 2d, 7d, 14d, 21d e 28d) por meio fresco e armazenado à -80° C. Células PC12 foram inoculadas em placas de 24 poços (3×10^4 células/poço) e cultivadas (em meio de cultura RPMI (1 mL/poço) previamente exposto às nanomatrizes (meio extrator). As células foram cultivadas por 7 dias e o meio de cultura foi substituído a cada 2 dias. Micrografias das células foram registradas através de um microscópio óptico e o número de células diferenciadas foi determinado. Células contendo ao menos 1 neurito maior que o diâmetro celular foram consideradas diferenciadas. Células cultivadas com meio RPMI suplementado ou não com NGF (50 ng/mL) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. A contagem celular foi feita em ao menos 5 campos por poço, em triplicata de três experimentos independentes.

3.6 Avaliação da degradação das nanomatrizes por gravimetria

Após os 28 dias de incubação em meio de cultura RPMI (meio extrator), as nanomatrizes foram coletadas, lavadas com PBS estéril, secas à 37°C sob vácuo e cuidadosamente pesadas em balança analítica. A diferença entre o peso inicial e o final das matrizes foi registrado, seguido da análise por MEV e determinação do diâmetro médio e da distribuição de frequência, conforme descrito anteriormente.

3.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas a partir dos experimentos individuais usando o programa GraphPad (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Influência do sistema de solventes e concentração da solução polimérica, do fluxo de infusão e da configuração do equipamento de *electrospinning* na obtenção de nanofibras de PCL

Inicialmente, foi projetado e desenvolvido um equipamento de *electrospinning* para a obtenção de nano e microfibras poliméricas. Nesta primeira etapa, foram estudadas as variáveis associadas à solução polimérica (sistema de solvente e concentração de PCL), fluxo de infusão e configuração do sistema coletor de forma a compreender e otimizar o processo para obtenção dos materiais pretendidos. A título de exemplo, a figura 7 mostra uma imagem de uma membrana (matriz) de PCL obtida no equipamento desenvolvido.

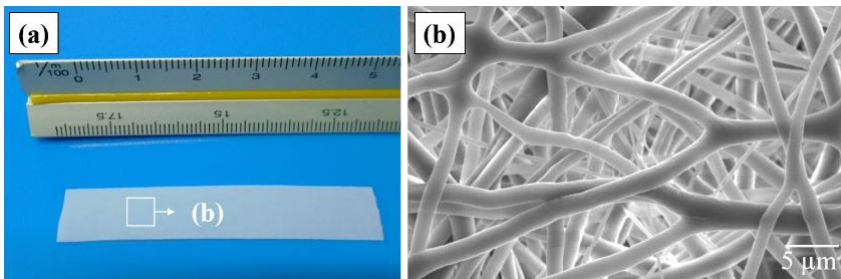


Figura 7. Imagens macroscópica (a) e de MEV (b) de uma matriz constituída por nano e microfibras obtida através da técnica de *electrospinning*.

A influência das características da solução polimérica, dos parâmetros processuais e da configuração do equipamento nas características de matrizes foi avaliada em relação à morfologia e diâmetro das fibras. Buscou-se otimizar o processo de forma a obter nano e microfibras uniformes de PCL, ou seja, sem a presença de estruturas esféricas ou fusiformes (*beads*) ao longo da fibra. Em todos os protocolos deste trabalho foi aplicada uma voltagem de 15 kV e a distância entre agulha e coletor foi de 10 cm. Uma série de protocolos foram realizados, com diferentes sistemas de solventes, concentrações e fluxos de infusão. Posteriormente as matrizes foram analisadas por MEV, para seleção dos melhores parâmetros processuais. Para avaliação de uma determinada variável, todas as demais permaneceram inalteradas.

A figura 8 mostra a influência de sistemas de solventes utilizados para solubilizar o PCL na concentração de 10% (m/v), na arquitetura das fibras. A utilização de clorofórmio: acetona (7: 3; v: v) deu origem a fibras com presença de *beads* e diâmetro médio de 390 ± 190 nm (figura 8a). Os sistemas de solvente clorofórmio: diclorometano: dimetilformamida (6: 1: 1; v: v: v) e clorofórmio: etanol (7: 3; v: v) originaram fibras uniformes, com diâmetro médio de 570 ± 275 nm e 642 ± 140 nm, respectivamente (figura 8b e 8c). Para a produção destas matrizes foi aplicado um fluxo de infusão de 1 mL/h e a configuração do equipamento considerou um coletor giratório com velocidade de 200 rpm.

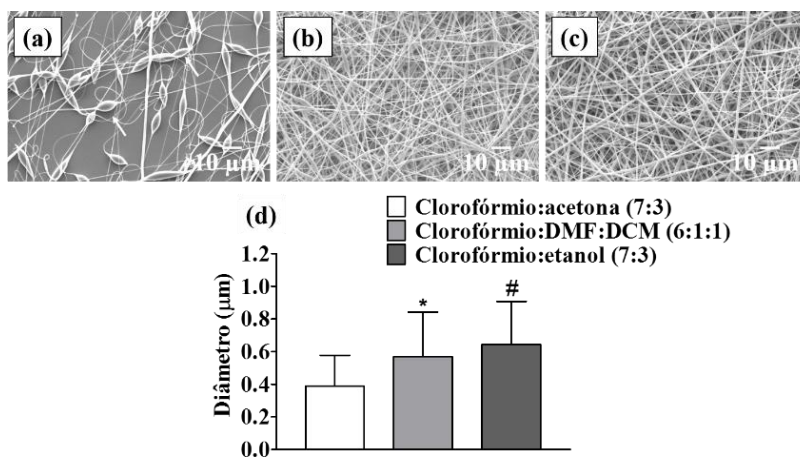


Figura 8. Influência do sistema de solventes na arquitetura de nanofibras de PCL. (a) clorofórmio: acetona (7: 3, v: v), (b) clorofórmio: diclorometano: dimetilformamida (6: 1: 1, v: v: v), (c) clorofórmio: etanol (7: 3, v: v). As barras (d) representam o diâmetro médio \pm erro padrão da média de três experimentos independentes de nanofibras produzidas com clorofórmio: acetona (390 ± 190 nm), clorofórmio: diclorometano: dimetilformamida (570 ± 275 nm), clorofórmio: etanol (642 ± 140 nm). Os símbolos (*) e (#) indicam diferença estatística entre cada grupo experimental ($P < 0,05$), obtida através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey.

Mantendo os parâmetros processuais e configuração descritos anteriormente, foi avaliada a influência de três concentrações de PCL: 8, 10 e 12% (m/v), utilizando como solventes clorofórmio: etanol (7: 3, v: v) (figura 9). Na menor concentração (8%, m/v), foram obtidas fibras com a presença de *beads* e um diâmetro médio de 439 ± 142 nm (figura 9a). Com um aumento da concentração do polímero para 10% ou 12% (m/v), foram obtidas fibras uniformes com diâmetro médio de 616 ± 243 (figura 9b) e 694 ± 296 nm (figura 9c), respectivamente.

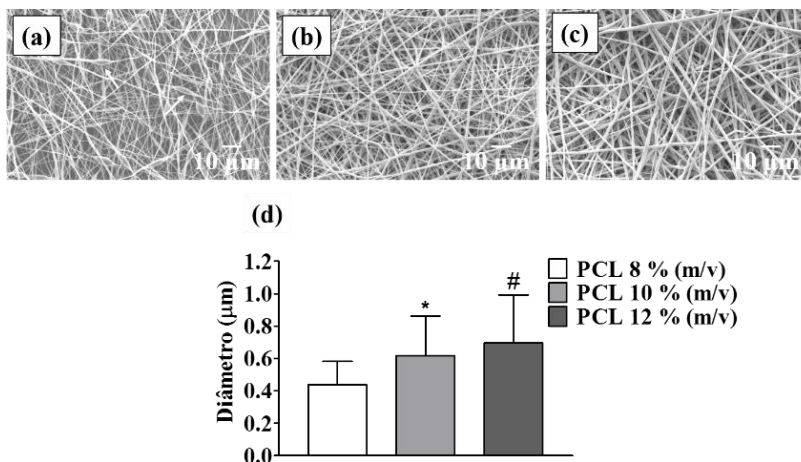


Figura 9. Influência da concentração da solução de PCL na arquitetura e diâmetro das fibras. (a) PCL 8% (m/v), (b) PCL 10% (m/v) e (c) PCL 12% (m/v). As barras (d) representam o diâmetro médio \pm erro padrão da média de três experimentos independentes de nanofibras produzidas com uma concentração de PCL de 8% (439 ± 142 nm), 10% (616 ± 243 nm) e 12% (694 ± 296 nm). Os símbolos (*) e (#) indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais, obtidas através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey.

A influência do fluxo de infusão na característica das fibras foi avaliada considerando uma solução de PCL 10% (m/v) em clorofórmio: acetona (7: 3, v: v), e um coletor giratório com velocidade de 200 rpm. Diferentes fluxos de infusão foram avaliados: 1, 5 e 15 mL/h. Fibras com a presença de *beads* foram obtidas para todos os fluxos avaliados (figura 10). Com o aumento do fluxo de 1 para 5 mL/h, um aumento do diâmetro médio das fibras de 388 ± 189 nm para 507 ± 245 nm foi detectado, além do aumento do tamanho dos *beads* (figura 10a e 10b). Não foi observado aumento adicional no diâmetro médio (536 ± 339 nm) com o fluxo aplicado de 10 mL/h., porém, fibras defeituosas com acúmulo de polímero e *beads* foram observadas (figura 10c).

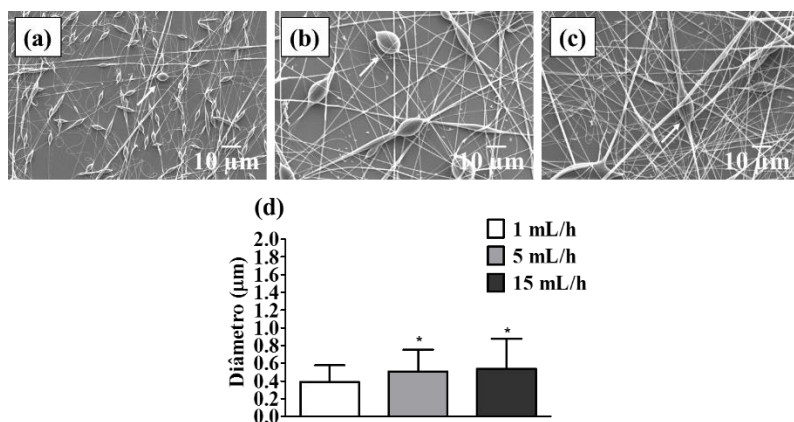


Figura 10. Influência do fluxo de infusão na arquitetura e diâmetro das fibras. (a) 1 mL/h, (b) 5 mL/h, (c) 15 mL/h. As barras (d) representam o diâmetro médio \pm erro padrão da média de três experimentos independentes de nanofibras produzidas com um fluxo de infusão de 1 mL/h (388 ± 189 nm), 5 mL/h (507 ± 245 nm) e 15 mL/h (536 ± 339 nm). O símbolo (*) indica diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$), obtidas através do teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo Teste de Tukey.

Em relação à configuração do equipamento de *electrospinning*, o sistema coletor constitui um dos parâmetros de maior impacto nas características das matrizes. A figura 11 mostra a influência da velocidade de rotação de um coletor de tambor rotatório ajustado a 0, 800 e 2000 rpm. PCL 10 % (m/v) foi dissolvida em clorofórmio: diclorometano: dimetilformamida (6: 1: 1; v: v: v) e os demais parâmetros processuais foram mantidos, sendo o fluxo de infusão ajustado à 1 mL/h. O coletor estático (0 rpm), originou fibras randomizadas com diâmetro médio de 1142 ± 391 nm e distribuição de frequência bimodal (figura 11a e 11b).

Com o aumento da velocidade de rotação para 800 e 2000 rpm, houve uma redução no diâmetro médio das fibras para 663 ± 334 e 688 ± 321 nm, respectivamente. Com este aumento, uma tendência ao alinhamento das fibras e uma redução na distribuição de frequência, que apresentou uma característica unimodal, foi observada (figura 11c-f).

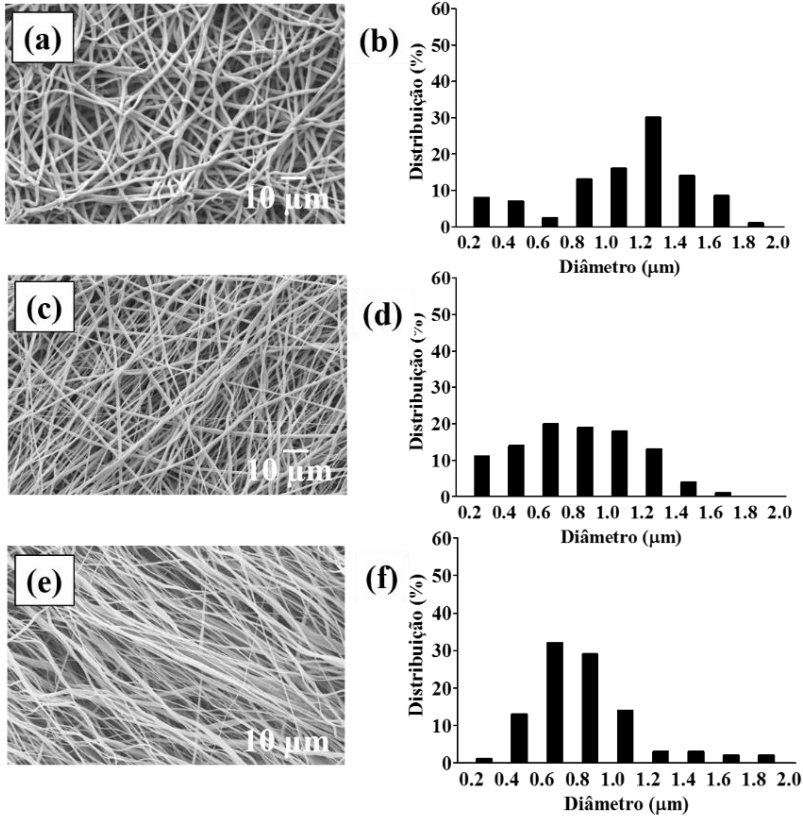


Figura 11. Influência da velocidade de rotação do coletor cilíndrico rotatório na arquitetura e frequência de distribuição de fibras de PCL. MEV e respectivas frequências de distribuição de diâmetro médio de nanofibras produzidas com coletor cilíndrico ajustado a 0 rpm (a, b), 800 rpm (c, d) e 2000 rpm (e, f). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Mantendo a velocidade de rotação do coletor em 2000 rpm e reduzindo o fluxo de 1 para 0,1 mL/h, notamos uma redução no diâmetro para 366 ± 203 nm e uma maior uniformidade na distribuição (figura 12).

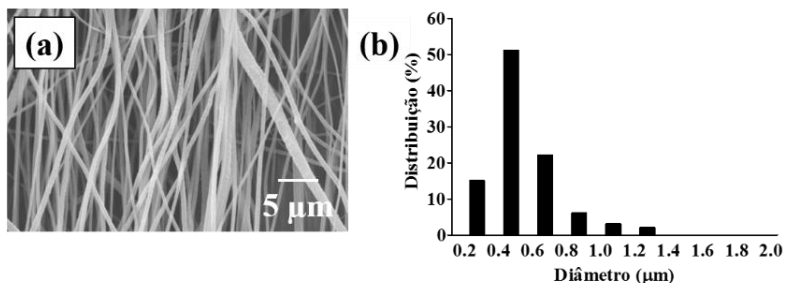


Figura 12. Influência da redução do fluxo de infusão na frequência de distribuição. MEV (a) e frequências de distribuição de diâmetro médio (b) de nanofibras produzidas com coletor de tambor rotatório ajustado à 2000 rpm, com um fluxo de infusão de 0,1 ml/h. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Buscando um melhor alinhamento, foram avaliados sistemas coletores constituídos de fios de cobre posicionados paralelamente. A uma distância de 1 cm, nanofibras alinhadas com um diâmetro médio de 490 ± 131 nm e maior uniformidade de distribuição em relação aos protocolos anteriores foram obtidas (figura 13).

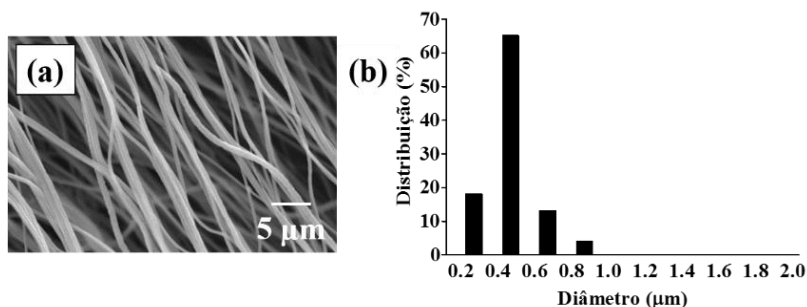


Figura 13. MEV (a) e respectivas frequências de distribuição de diâmetro médio (b) de nanofibras produzidas com um coletor de cabos paralelos posicionados a 1 cm de distância entre si, com um fluxo de infusão de 1 mL/h. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

A figura 14 compara alinhamentos obtidos através da utilização do coletor rotatório ajustado a 2000 rpm e um fluxo de infusão de 1 mL/h ou 0,1 mL/h e o coletor estático de cabos paralelos, posicionados a 1 cm de distância entre si. O melhor alinhamento foi obtido com o coletor cilindro ajustado à 2000 rpm e um fluxo de infusão de 0,1 mL/h, sendo esta configuração escolhida à produção de nanofibras alinhadas nos protocolos subsequentes.

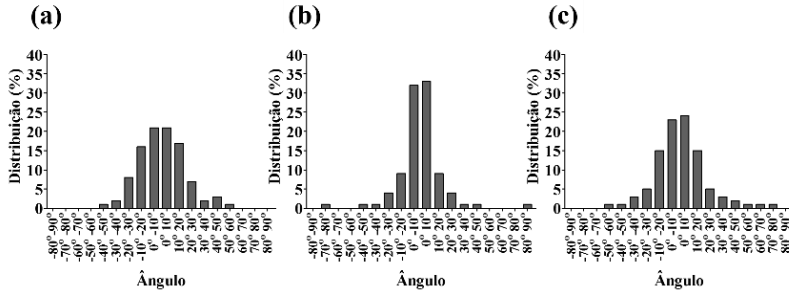


Figura 14. Análise de alinhamento das nanofibras mostrando o seu desvio de orientação. As matrizes foram produzidas em coletor rotatório ajustado a 2000 rpm e fluxo de infusão de 1mL/h (a) ou 0,1 mL/h (b), ou em coletor de fios de cobre paralelos e com um fluxo de infusão de 1 mL/h (c). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

O alinhamento obtido utilizando o coletor de cabos de cobre, apesar de satisfatório, foi observado apenas com a deposição de 1 mL de solução polimérica. Após 1 mL de aplicação, um novo padrão de organização das fibras, caracterizado pela presença de feixes de fibras alinhadas dispostas ao longo da matriz (figura 15a e 15b). Entre estes feixes, dois distintos padrões de fibras foram observados: fibras curvilíneas com diâmetro médio de 1132 ± 364 (figura 15c) e fibras randomizadas com diâmetro médio de 730 ± 384 nm localizadas próximas aos feixes de fibras alinhadas (figura 15d).

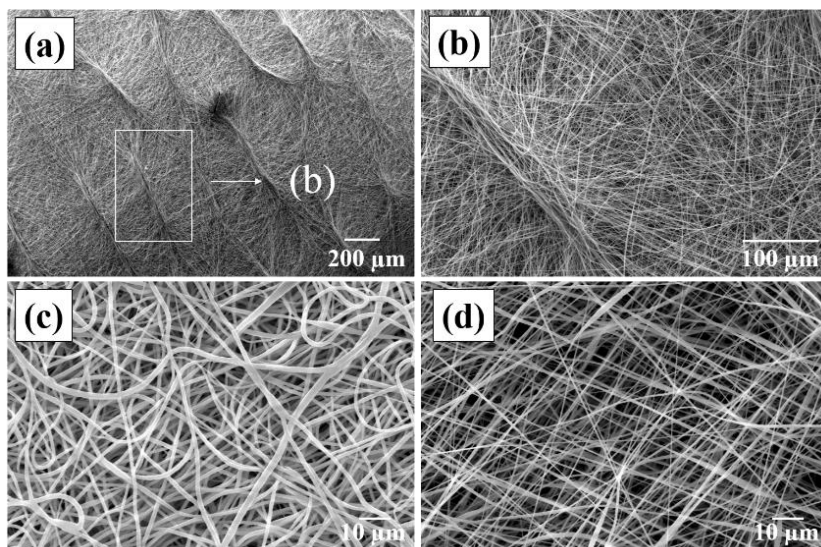


Figura 15. MEV do padrão de nanofibras produzidas utilizando-se coletor de fios de cobre paralelos (distância= 1 cm) após a aplicação de 1 mL de solução polimérica. Estruturas formadas por uma alta densidade de fibras alinhadas (a). Detalhe da imagem a (b); e padrão de fibras observados ao longo da matriz (c, d). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Para obtenção de uma estrutura tridimensional tubular, fundamental à obtenção de um guia de nervo, foi utilizado o coletor de mandril ajustado a 2000 rpm (figura 16). Os parâmetros processuais consideram um fluxo de 3mL/h, uma distância de 10 cm e um sistema de solventes de clorofórmio:etanol (7:3, v:v). Um padrão repetitivo de feixes de nanofibras alinhadas e fusionadas, separadas por espaço de 150-200 μm , dispostas de forma transversal ao eixo do mandril, foi observado. Entre esses feixes, nota-se a presença de fibras com diâmetro médio de 606 ± 329 nm dispostas paralelamente ao eixo do mandril (figura 16c e 16d).

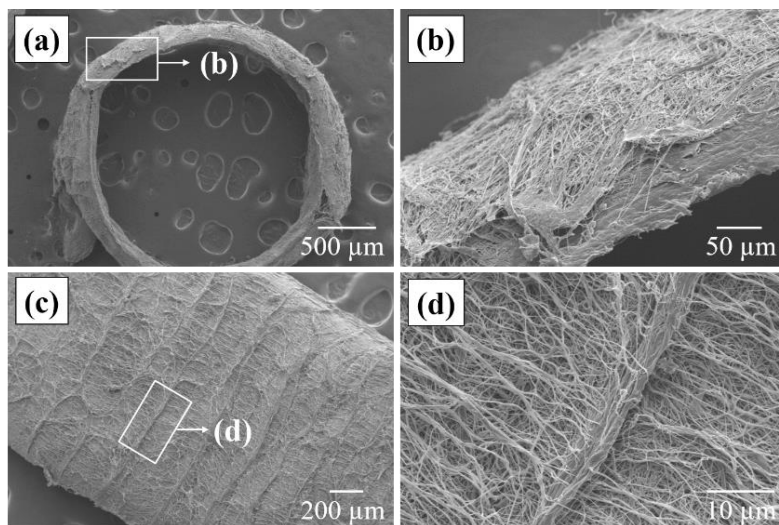


Figura 16. *Scaffold* tubular produzido com o coletor de mandril ajustado a uma velocidade de rotação de 2000 rpm. MEV do padrão de nanofibras obtido. Vista em corte transversal (a, b) e longitudinal (c, d). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.2 Influência do PEG em nanofibras de PLC

No presente trabalho, a adição de PEG na solução de PCL objetivou gerar nanocompósitos com um maior controle da degradabilidade e da cinética de liberação de NGF. A figura 17 mostra imagens de MEV e as frequências de distribuição do diâmetro das fibras dos compósitos de PCL e PCL/PEG. Nano e microfibras homogêneas e randomizadas foram observadas na maioria das matrizes produzidas. Entretanto, regiões com aglomerações de fibras fusionadas foram formadas na matriz constituída de PCL/PEG 400 (10: 1 m/m) (figura 17c). Quando PEG foi adicionado à solução de PCL, uma menor amplitude de distribuição de diâmetros foi observada para todos os pesos moleculares de PEG avaliados, i.e., maior uniformidade.

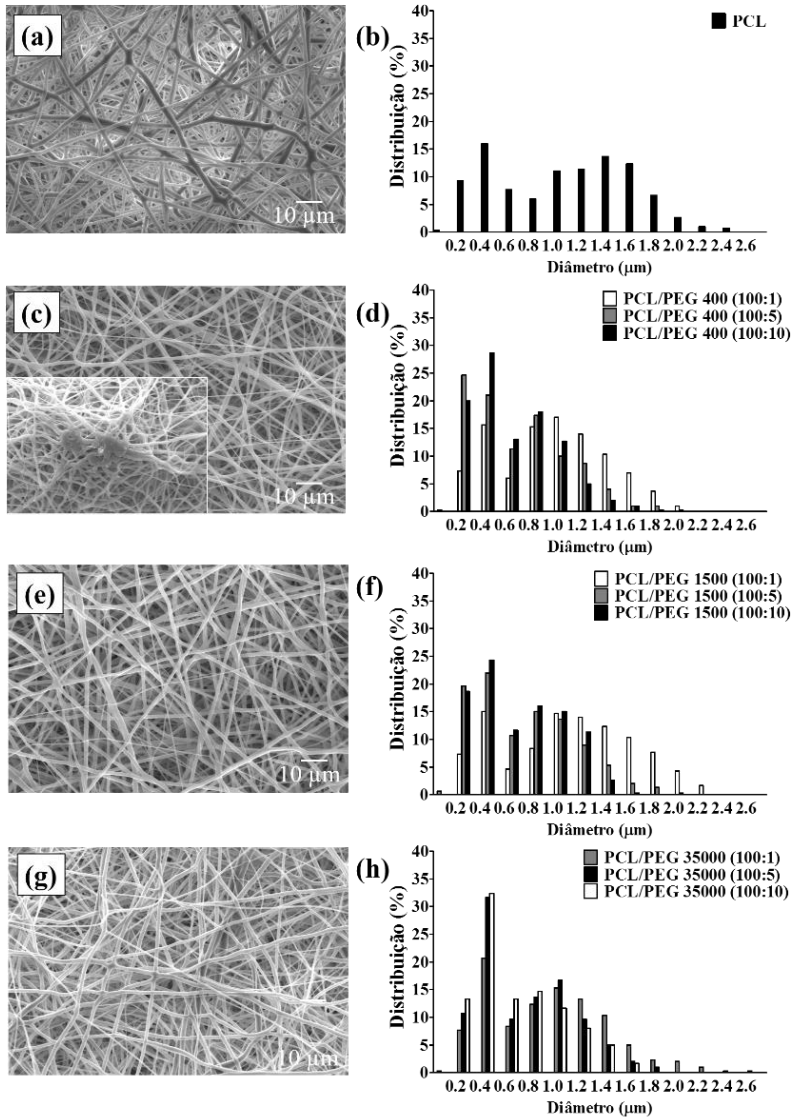


Figura 17. MEV e as respectivas frequências de distribuição do diâmetro das fibras de matrizes constituídas de PCL (a, b); PCL/PEG 400 (c, d); PCL/PEG 1500 (e, f) e PCL/PEG 35000 (g, h).

A influência do PEG foi avaliada na morfologia e nas propriedades mecânicas das fibras de PCL. O diâmetro médio, módulo de Young, tensão à ruptura e alongamento percentual obtidos a partir de ensaios de testes de tensão uniaxial estão representadas na figura 18. De maneira geral, a adição de PEG causou uma diminuição no diâmetro médio das fibras e também uma redução da tensão à ruptura e do alongamento percentual (tabela 1).

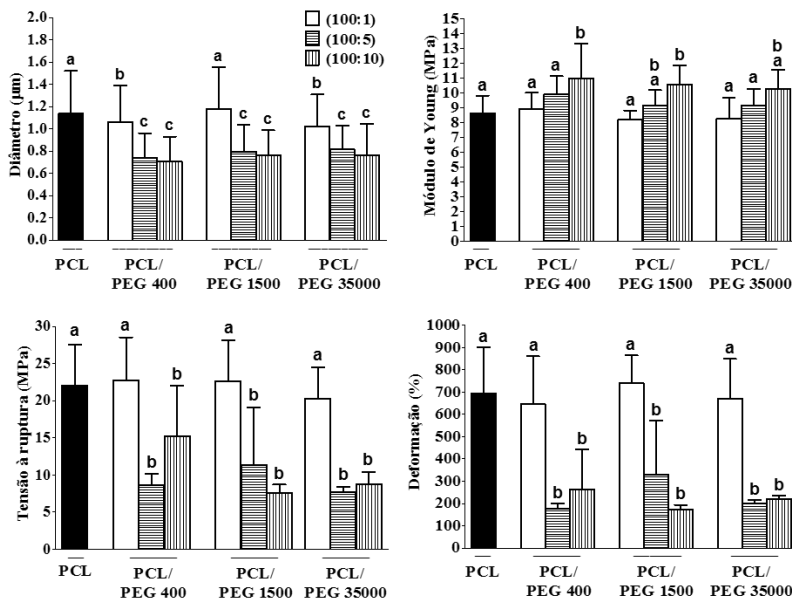


Figura 18. Efeito do PEG no diâmetro e nas propriedades mecânicas de nanofibras constituídas por PCL ou por blends de PCL e PEG. Diâmetro médio de fibras, módulo de Young, tensão à ruptura e porcentagem de deformação de matrizes de PCL e PCL/PEG. Os valores são expressos como Médias \pm Erro Padrão da Média de triplicatas de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos experimentais ($P < 0,05$), pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey.

Tabela 1. Diâmetro médio e propriedades mecânicas das matrizes de PCL e PCL/PEG.

Amostra	Diâmetro Médio (μm)	Módulo de Young (MPa)	Tensão à ruptura (MPa)	Porcentagem de deformação (%)
PCL	1.136 \pm 0.384	8.64 \pm 1.17	22.09 \pm 5.45	692.8 \pm 207
PCL/PEG 400 Da (100:1)	1.061 \pm 0.327	8.91 \pm 1.09	22.79 \pm 5.77	646.9 \pm 214
PCL/PEG 400 Da (100:5)	0.737 \pm 0.224	9.92 \pm 1.21	8.658 \pm 1.51	176.1 \pm 25.7
PCL/PEG 400 Da (100:10)	0.705 \pm 0.222	11.0 \pm 2.33	15.24 \pm 6.75	321.6 \pm 242
PCL/PEG 1500 Da (100:1)	1.180 \pm 0.375	8.18 \pm 0.62	22.68 \pm 5.45	739.2 \pm 125
PCL/PEG 1500 Da (100:5)	0.797 \pm 0.241	9.12 \pm 1,67	11.40 \pm 7.64	330.4 \pm 242
PCL/PEG 1500 Da (100:10)	0.764 \pm 0.221	10.54 \pm 1.31	7.607 \pm 1.09	174.2 \pm 19.7
PCL/PEG 35 kDa (100:1)	1.023 \pm 0.285	8.23 \pm 1.45	20.32 \pm 4.18	670.7 \pm 178.7
PCL/PEG 35 kDa (100:5)	0.813 \pm 0.215	9.13 \pm 1.15	7.718 \pm 0.67	199.1 \pm 15.16
PCL/PEG 35 kDa (100:10)	0.760 \pm 0.280	10.27 \pm 1.27	8.799 \pm 1.60	219.4 \pm 15.38

4.3 Estudos de cultura celular

4.3.1 Citotoxicidade

O requerimento básico ao uso de materiais como *scaffolds* para engenharia de tecidos é a sua biocompatibilidade. A avaliação da citotoxicidade das matrizes de PCL e PCL/PEG (400 Da, 1500 Da, e 35000 Da) 10: 1 (m/m), foi realizada usando fibroblastos de murino L929. A atividade mitocondrial foi avaliada pelo método do MTT, no qual a densidade ótica é proporcional à percentagem de células viáveis cultivadas com meio DMEM, previamente expostos às matrizes (meio extrator), e comparado com o controle (meio DMEM fresco). Os resultados estão representados na figura 19. Não foi observada diferença estatística entre as células cultivadas com meio extrator e o controle.

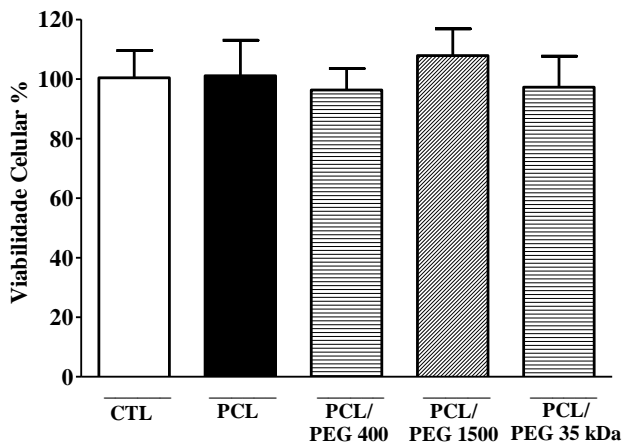


Figura 19. Citotoxicidade indireta de matrizes de PCL e PCL/PEG para linhagem celular de fibroblastos L929, através do método de MTT. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços numa concentração de 5×10^3 células por poço. Após 24 horas, o meio fresco foi substituído por meio previamente exposto às matrizes constituídas por PCL ou por blendas de PCL e PEG durante 24 horas (meio extrator). As células foram cultivadas por adicionais 48 horas previamente ao ensaio do MTT. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (n=18).

A citotoxicidade também foi avaliada pelo método de sobreposição do gel de agarose (agarose overlay) e os resultados são mostrados na figura 20. Não foi observada zona de lise ou mudança na morfologia celular entre as células tratadas com as matrizes (figura 20c e 20d) e o controle negativo (figura 20b).

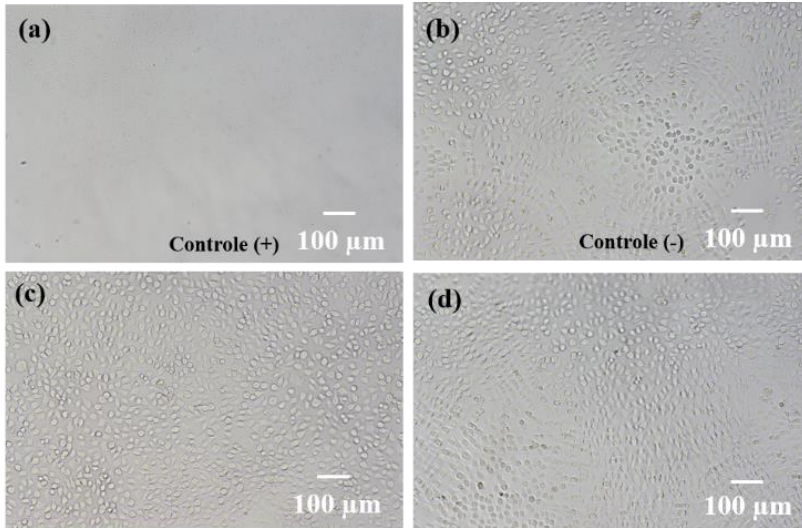


Figura 20. Citotoxicidade indireta de matrizes de PCL e PCL/PEG através do método agarose overlay. Células L929 foram plaqueadas em placas de 6 poços numa concentração de 2×10^6 células por poço. Após as células atingirem confluência, o meio fresco foi substituído por uma solução de agarose e meio de cultura. Após a geleificação da solução, discos de 6 mm de diâmetro de matrizes constituídas por PCL ou por blendas de PCL e PEG foram posicionados sobre o gel. As células foram cultivadas por adicionais 24 horas e, em seguida, os discos foram retirados e foi adicionada uma solução de MTT sobre o gel. Neste método, a presença de halo indica citotoxicidade devido à ausência de formação de cristais de formazan. Como controle positivo foram utilizados discos de celulose embebidos em SDS e como controle negativo foram utilizados discos de celulose. Imagens ópticas representativas de linhagem celular de fibroblastos L929, após exposição ao controle positivo (a), controle negativo (b), matrizes de PCL (c) e PCL/PEG (d). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

4.3.2. Avaliação das matrizes de PCL e PCL/PEG como suportes (*scaffolds*) para cultura celular e sistema de liberação de NGF

A versatilidade da tecnologia de *electrospinning* permite projetar *scaffolds* com uma arquitetura adequada a determinada aplicação. Nesse sentido, estudos prévios demonstraram que *scaffolds* constituídos por fibras alinhadas induzem o alinhamento de prolongamentos denominados neuritos ou axônios de células nervosas e propõem sua aplicação à regeneração axônios e nervos (XIE *et al.*, 2009; NEAL *et al.*, 2014). Neste trabalho, a influência das matrizes de PCL e PCL/PEG na morfologia celular foi determinada através do cultivo de células PC12 sobre as matrizes. Sabe-se que em presença de NGF estas células diferenciam-se emitindo neuritos (OSHIMA *et al.*, 1991).

A figura 21 mostra imagens de células PC12 cultivadas com RPMI na ausência (figura 21a) e presença de NGF (figura 21b).

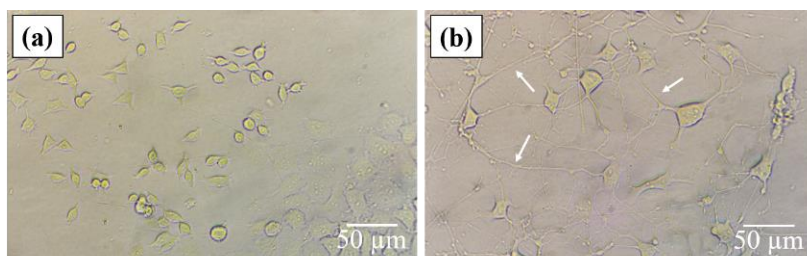


Figura 21. Micrografias óticas de células PC12 cultivadas em meio RPMI fresco (a) e adicionado de 50 ng/ml de NGF (b). As setas indicam neuritos.

Micrografias de MEV e de microscopia de fluorescência de células PC12 cultivadas sobre matrizes de PCL são mostradas na figura 22. Quando cultivadas sobre fibras randomizadas, em ausência de NGF, as células apresentaram uma morfologia típica poligonal, em pequenos aglomerados (figura 22a e 22b). Na presença de NGF (50 ng/mL), células diferenciadas apresentando um soma maior e mais espreado e neuritos sobre as fibras randomizadas foram observadas (figura 22c e 22d). Quando cultivadas sobre fibras alinhadas, também em presença de NGF (50 ng/mL), nota-se a presença de células diferenciadas com neuritos alinhados (figura 22e e 22f).

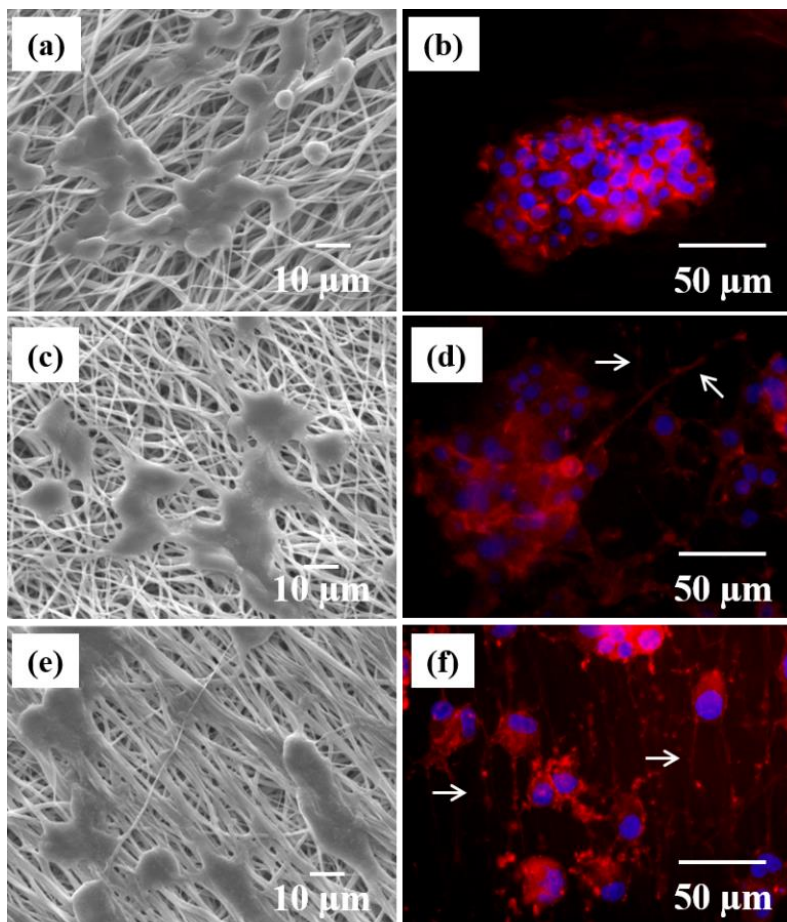


Figura 22. Influência da arquitetura da matriz de PCL e do alinhamento das fibras na morfologia de células PC12. Micrografias de MEV e de microscopia de fluorescência de células da linhagem PC12 de feocromocitoma cultivadas por sete dias sobre matrizes de PCL com fibras randomizadas na ausência (a e b) ou presença de NGF (c e d); e sobre matrizes com fibras alinhadas na presença de NGF (e e f). Foram realizados três ensaios independentes em triplicata. Setas indicam a presença de neuritos.

A atividade de moléculas biológicas como os fatores de crescimento e outras proteínas pode ser comprometida pelas condições processuais do ES como temperatura, pH, corrente elétrica ou por solventes orgânicos (WALTER *et al.*, 1999; SANDERS *et al.*, 2003). Para avaliar a atividade do NGF liberado das matrizes de PCL e PCL/PEG, a percentagem de células PC12 diferenciadas foi calculada após o cultivo com o meio de cultura extrator, previamente exposto às matrizes nos diferentes períodos de tempo. A bioatividade do NGF foi preservada em todas as matrizes avaliadas. Entretanto, para as matrizes de PCL/PEG 400 e PCL/PEG 1500, o número de células diferenciadas foi maior nos períodos do 7º, 14º, 21º e 28º dias de avaliação. Por sua vez, para a matriz de PCL/PEG 35 kDa um maior número de células diferenciadas foi observado após o 21º dia (figura 23 e 24).

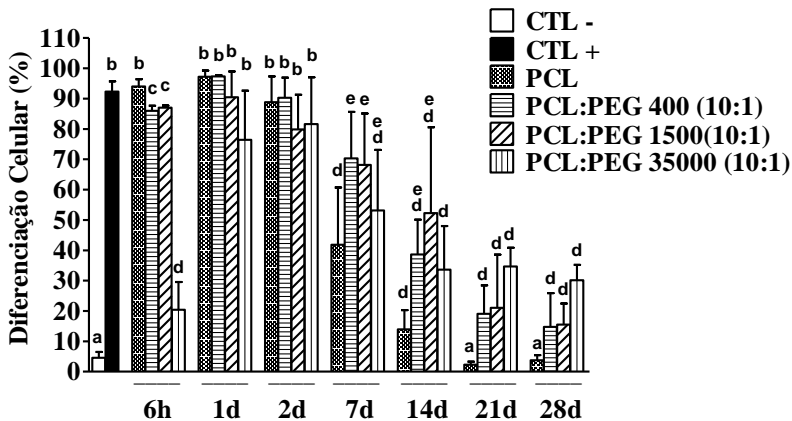


Figura 23. Liberação e bioatividade do NGF liberado de matrizes de PCL e PCL/PEG durante 28 dias. As matrizes foram transferidas para frascos de cultura e expostas a meio RPMI fresco. Nos períodos de tempo indicados, o meio foi retirado e armazenado (meio extrator), e substituído por meio fresco. Assim, os dados indicam uma liberação de NGF não cumulativa. O meio extrator, contendo o NGF liberado da matriz durante o período indicado foi utilizado para cultivo de células PC12. A Porcentagem de células PC12 diferenciadas, cultivadas em meio condicionado pela exposição às matrizes de PCL ou PCL/PEG nos diferentes períodos de tempo foram quantificadas através da avaliação da presença de neuritos. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$), pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey.

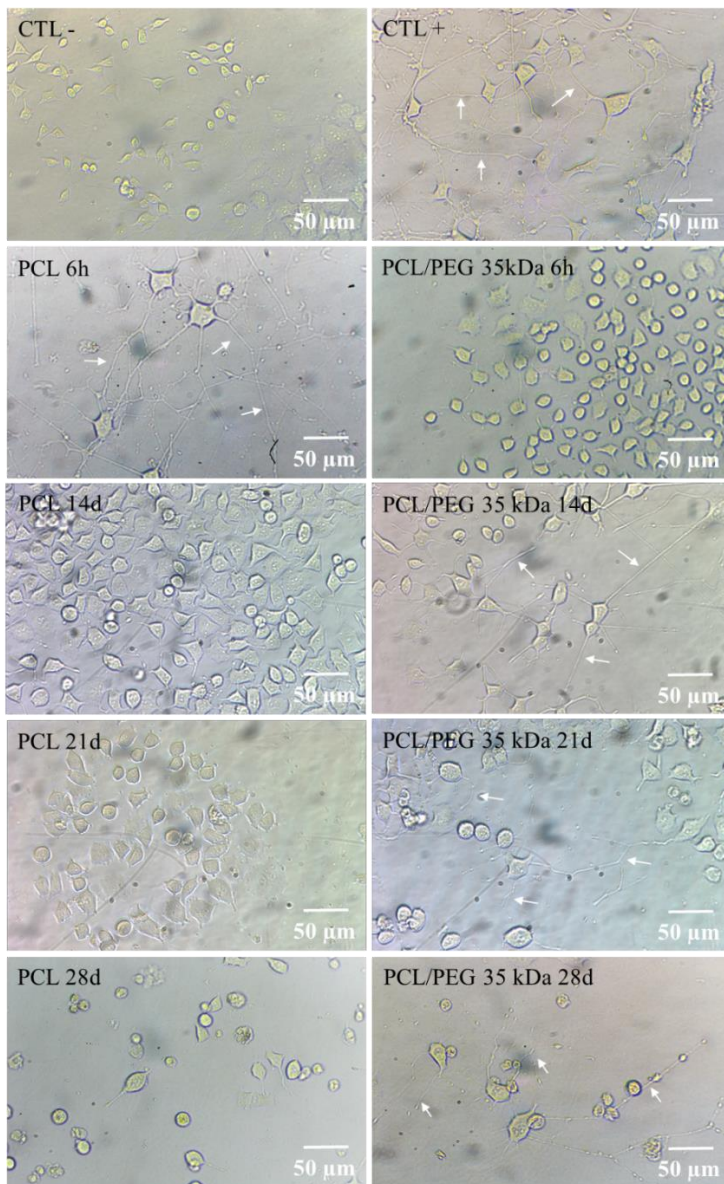


Figura 24. Liberação e bioatividade do NGF liberado de matrizes de PCL/PEG 35000. Imagens de microscopia ótica representativas de células PC12 cultivadas em meio condicionado pela exposição às matrizes de PCL e PCL/PEG 35 kDa . Setas indicam a presença de neuritos.

Imagens de MEV e a respectiva distribuição do tamanho das fibras de PCL e PCL/PEG foram obtidas após 28 dias de exposição ao meio RPMI (figura 25).

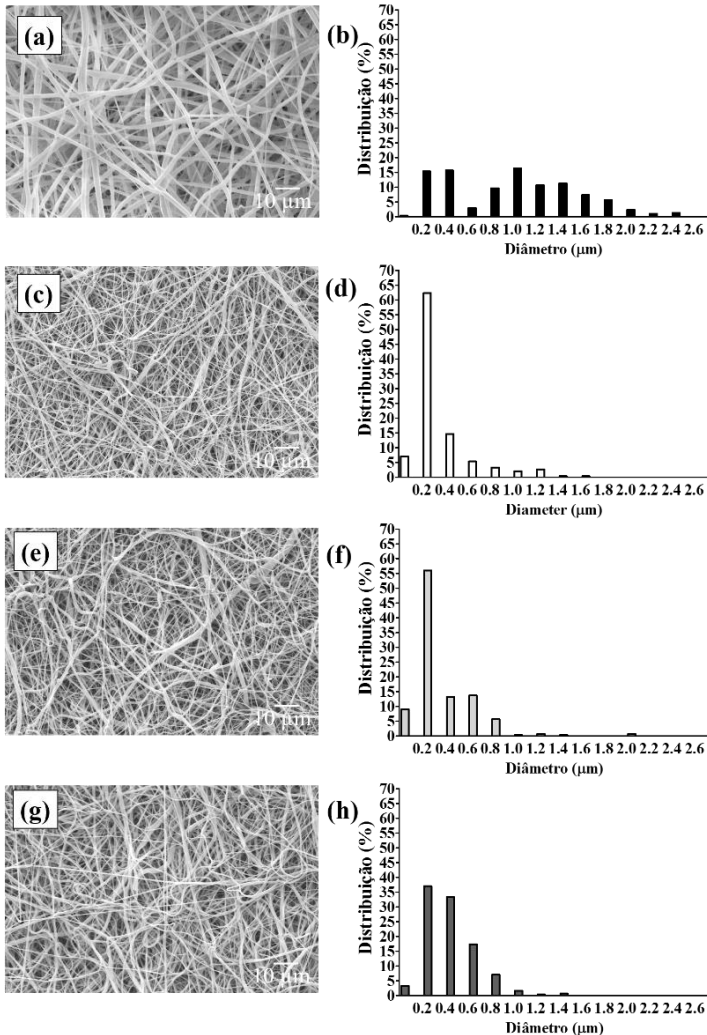


Figura 25. Arquitetura das matrizes de PCL e PCL/PEG avaliada após o estudo de liberação de NGF (28 dias). MEV e a respectiva frequência de distribuição do diâmetro das nanofibras de matrizes de PCL (a,b); PCL/PEG 400 (c, d); PCL/PEG 1500 (e, f) e PCL/PEG 35000 (g, h) após 28 dias de exposição ao meio de cultura RPMI. Foram realizados três ensaios independentes em triplicata.

Uma menor amplitude de distribuição e diâmetro médio foram observados para as matrizes contendo 10 % de PEG com os menores pesos moleculares (tabela 2), enquanto menor perda de peso foi detectada com o tratamento com PEG de alto peso molecular (figura 26).

Tabela 2. Diâmetro médio de matrizes de PCL e PCL/PEG antes (t_0) e após (t_{28d}) a exposição ao meio de cultura.

Amostra	$\bar{\varnothing} t_0$ (MEAN \pm SD)	$\bar{\varnothing} t_{28d}$ (MEAN \pm SD)
PCL	1.136 \pm 0.384	1.059 \pm 0.564
PCL/PEG 400 Da	0.705 \pm 0.222	0.441 \pm 0.263
PCL/PEG 1500 Da	0.764 \pm 0.221	0.434 \pm 0.303
PCL/PEG 35 kDa	0.760 \pm 0.280	0.497 \pm 0.222

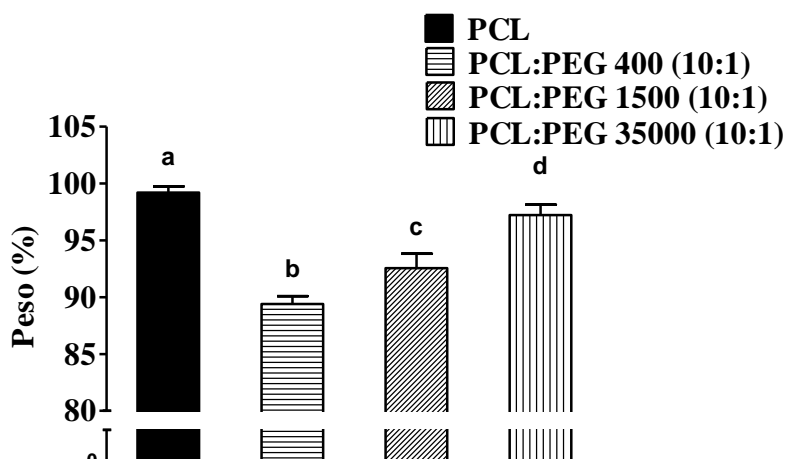


Figura 26. Perda de massa de matrizes de PCL e PCL/PEG após 28 dias de exposição ao meio de cultura RPMI. Peso médio das matrizes após 28 dias de exposição ao meio de cultura em relação ao seu peso original. Os dados foram expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$), pela ANOVA seguida pelo Teste de Tukey.

Em experimento subsequente, nanofibras alinhadas de PCL foram produzidas utilizando um coletor cilíndrico ajustado a 2000 rpm, visando a obtenção de um *scaffold* tridimensional com potencial aplicação em regeneração de nervos. Em seguida, esta matriz foi cuidadosamente transferida para o coletor de mandril, no qual foi aplicado 3 mL uma solução polimérica de PCL/PEG 35 kDa, contendo NGF ($12\mu\text{g} / \text{mL}$). Os parâmetros foram ajustados em 200 rpm, com um fluxo de infusão de 1 mL/h. A figura 27 mostra as imagens macroscópicas e de MEV do sistema de nanofibras randomizadas de PCL/PEG kDa contendo NGF na camada externa com diâmetro médio de $383 \pm 158 \mu\text{m}$ (figura 27b), e nanofibras alinhadas de PCL na camada interna com diâmetro médio de $724 \pm 403 \mu\text{m}$ (figura 27e).

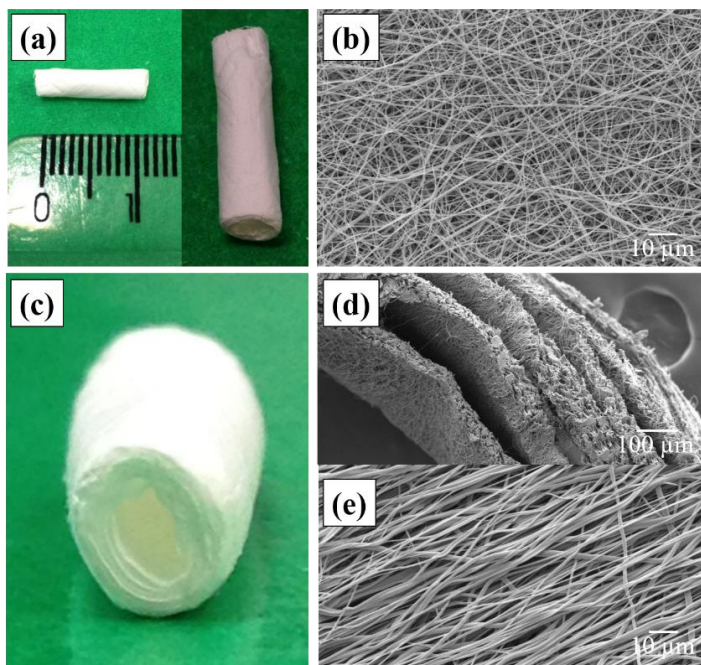


Figura 27. *Scaffold* tubular constituído por nanofibras de PCL alinhadas na face interna e nanofibras randomizadas de PCL/PEG 35 kDa contendo NGF ($12\mu\text{g}/\text{mL}$), na face externa. Nanofibras alinhadas foram produzidas em coletor rotatório à 2000 rpm. Em seguida, as matrizes foram transferidas para o coletor de mandril e uma nova camada de nanofibras foi depositada, aplicando uma velocidade de 200 rpm. Imagens macroscópicas (a, c) e de MEV do *scaffold*. MEV da camada externa (b), corte transversal (d) e camada interna (lúmen) (e).

Para avaliar a bioatividade deste nanosistema, células PC12 foram inoculadas no lúmen do *scaffold* e em placas de cultura de 24 poços. Os *scaffolds* contendo as células inoculadas foram transferidos às placas de cultivo e incubados por 7 dias, sendo o meio de cultura substituído a cada 2 dias. A figura 28 mostra micrografias de fluorescência das células presentes no lúmen do *scaffold* marcadas com DAPI (figura 28a) ou DAPI e faloidina (figura 28b) e imagens de MEV (figura 28c), obtidas após os 7 dias de cultivo. Enquanto que micrografias ópticas das células cultivadas na placa de 24 poços, sob o *scaffold*, são mostradas na figura 28d. A análise da morfologia celular sugere que houve diferenciação celular induzida pelo NGF liberado do *scaffold*, o que confirma os resultados anteriores.

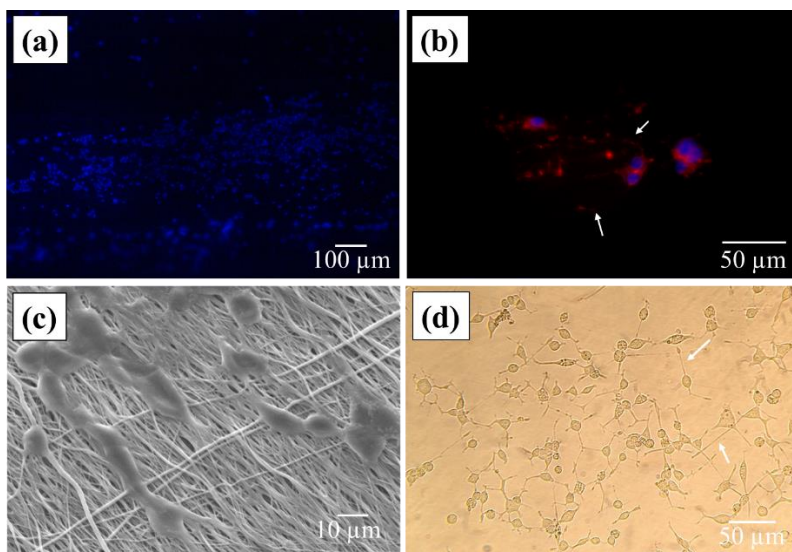


Figura 28. Efeito do *scaffold* tubular na diferenciação de células PC12. As células PC12 foram cultivadas no lúmen do *scaffold* constituído de PCL/PEG 35 kDa contendo NGF (12 μ g/mL) e em placas de 24 poços, sob o *scaffold*. Após sete dias de cultivo, as células presentes no lúmen foram fixadas e marcadas com DAPI (a) ou DAPI e faloidina (b) e observadas sob microscopia de fluorescência, e por MEV (c). Micrografias das células cultivadas sob o *scaffold* foram obtidas através de microscopia óptica (d). As setas indicam a presença de neuritos.

5. DISCUSSÃO

5.1 Influência do sistema de solventes e concentração da solução polimérica, do fluxo de infusão e da configuração do equipamento de *electrospinning* na obtenção de nanofibras de PCL

Através da tecnologia de ES é possível produzir *scaffolds* nanofibrosos a partir de uma ampla gama de polímeros naturais, sintéticos ou misturas de ambos. A estrutura tridimensional altamente porosa gerada pelo diâmetro extremamente reduzido das fibras dá origem a materiais porosos com grande área superficial em relação ao volume. Além disso, esta tecnologia permite a obtenção de *scaffolds* com arquiteturas macro e microscópicas diversas. Devido a estas características, à versatilidade e à viabilidade de escalonamento da produção, esta tecnologia vem sendo intensivamente investigada para o desenvolvimento de dispositivos médicos à regeneração tecidual e engenharia de tecidos. Nesse sentido, a estrutura destes *scaffolds* deve ser projetada considerando as características do tecido lesionado visando uma regeneração tecidual adequada (RAMAKRISHNA *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2014).

Desta forma, a etapa inicial deste trabalho foi dedicada ao estudo da influência das variáveis de configuração operacional relacionadas ao processo de ES, visando sua otimização à obtenção de um *scaffold* com fibras randomizadas e alinhadas com potencial aplicação em regeneração de nervos. Nesta tecnologia, todas as variáveis atuam de forma interdependente (GARG & BOWLIN, 2011). Portanto, para avaliá-las individualmente, foi necessário fixar as restantes de forma a compreender os fenômenos envolvidos no processo. Foi realizada uma análise sistemática da influência destas variáveis na arquitetura das fibras, considerando o seu diâmetro e alinhamento. Esta caracterização foi feita através da análise de imagens de MEV para cada uma das nanomatrizes.

A viabilidade do processo de ES depende fundamentalmente da geração de um campo elétrico para indução de um fluido em direção ao coletor. Portanto, a voltagem aplicada deve criar uma corrente elétrica capaz de superar o limiar que origina o cone de Taylor e, subsequentemente, superar a tensão superficial de uma determinada solução polimérica. Por conseguinte, as características desta solução determinam este limiar e a faixa de tensão elétrica, ou voltagem ideal para produzir nano e microfibras sem a presença de *beads* (DEITZEL *et al.*, 2001). O efeito da voltagem no diâmetro das fibras foi estudado por diversos grupos. ZHANG e colaboradores (2005) relataram um aumento no diâmetro médio de fibras de álcool polivinílico com o aumento da voltagem. Efeito similar foi observado por MEECHASUE e

colaboradores (2006) na produção de fibras de policarbonato, o que foi relacionado a um aumento na taxa do fluxo de massa. Por outro lado, uma diminuição no diâmetro das fibras causado pelo aumento da voltagem foi relatada por YUAN e colaboradores (2004) que utilizaram a polissulfona à produção de nanofibras. STILL & VON RECUM (2008) sugerem que a redução do diâmetro das fibras é ocasionada pelo aumento da força de estiramento causado pelo aumento da voltagem. Neste trabalho, a voltagem de 15 Kv foi adequada para produzir nano e microfibras de PCL e PCL/PEG sem presença de beads. Deste modo, foi a voltagem escolhida à aplicação em todos os protocolos experimentais.

Durante o processo de ES, o fluxo do jato eletrificado, o estiramento, a evaporação do solvente, a secagem e a deposição das fibras são eventos que ocorrem sequencialmente no espaço entre a extremidade da agulha e o coletor. Conseqüentemente, esta distância deve ser ajustada para permitir a evaporação do solvente antes das fibras atingirem o coletor. Curtas distâncias podem causar *beads*, defeitos, ou fibras com grandes diâmetros, enquanto longas distâncias favorecem a redução das fibras. Entretanto, uma distância ideal dependerá das características do polímero e do sistema de solventes (BHARDWAJ & KUNDU, 2010). A distância utilizada neste trabalho foi fixada em 10 cm, sendo satisfatória à obtenção de fibras uniformes.

Outra característica importante da solução polimérica é a sua condutividade, devido à formação do jato ser dependente da força de Coulomb da solução e do campo elétrico. O aumento da condutividade está relacionado à redução do diâmetro das fibras, contudo, um aumento excessivo inviabiliza a sua formação (SUN *et al.*, 2014; ANGAMMANA & JAYARAM, 2011; CHOI *et al.*, 2004). Desta forma, o sistema de solventes exerce um papel fundamental no processo de ES e na arquitetura das fibras. Os solventes devem ter um alto momento dipolo para gerar soluções com adequada condutividade, e vapor de pressão para permitir a sua evaporação durante a formação das fibras. Solventes com alto vapor de pressão podem causar problemas como solidificação do polímero e bloqueio da agulha. Ao contrário, solventes com baixo vapor de pressão podem causar *beads* ou fibras defeituosas, caso o solvente não evapore antes de atingir o coletor (JARUSUWANNAPOOM *et al.*, 2005).

O clorofórmio é um dos solventes mais comuns ao preparo de soluções de PCL para ES, embora este solvente induza a formação de fibras na escala micrométrica (DEL GAUDIO *et al.*, 2009; LOWERY, DATTA & RUTLEDGE, 2010). Para reduzir o diâmetro das fibras, uma abordagem comum é o uso de um sistema binário de solventes, com a

adição de um segundo solvente ao clorofórmio. NOTTELET e colaboradores (2009) reportaram o uso de sistemas binários constituídos de clorofórmio:acetona (7:3, v: v) e clorofórmio:etanol (7:3, v: v) para obtenção de fibras de PCL. Nanofibras sem a presença de *beads* foram obtidas com ambos solventes estudados para uma concentração de PCL de 12 ou 15% (m:v) e fibras com *beads* foram observados em concentrações menores. Com base neste trabalho, ambos os sistemas supracitados foram avaliados. O uso do sistema clorofórmio/ etanol propiciou a obtenção de fibras uniformes, enquanto a utilização de acetona resultou em fibras com um menor diâmetro em relação ao sistema com etanol, porém com marcada presença de *beads*, eventualmente determinada por alterações na viscoelasticidade, densidade de carga e tensão superficial da solução polimérica; fatores determinantes das características das fibras (FONG, CHUN & RENEKER, 1999).

BOLGEN e colaboradores (2005) relataram que o aumento da proporção de dimetilformamida no sistema de solvente contendo clorofórmio causa uma diminuição do diâmetro de fibras de PCL. LAIVA e colaboradores (2014) estudaram o efeito de solventes binários, i.e., 90 % de clorofórmio (v: v) e 10 % de etanol, diclorometano ou dimetilformamida numa concentração polimérica de 16% (m: v). A presença de diclorometano produziu fibras de $6.2 \pm 1.2 \mu\text{m}$, enquanto sua substituição por dimetilformamida ou etanol causou uma diminuição no diâmetro para $2.3 \pm 0.3 \mu\text{m}$ e $3.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$, respectivamente. Este efeito pode estar associado à diminuição na tensão superficial e aumento na condutividade e constante dielétrica da solução polimérica (LEE *et al.*, 2003). Dessa forma, todos os sistemas avaliados neste trabalho deram origem a fibras com diâmetro na ordem dos nanômetros. Entretanto, devido a menor toxicidade e custo do etanol, o sistema clorofórmio: etanol (7: 3, v: v) foi adotado à produção das matrizes de PCL:PEG.

Dentre as variáveis que governam o processo de *electrospinning*, a concentração do polímero da solução é determinante à geração de nanopartículas ou nanofibras. Em baixas concentrações, nanopartículas são formadas num processo denominado *electrospray*. O aumento da concentração causa a formação de fibras com a presença de *beads*, e uma concentração ideal deve ser alcançada para a obtenção de nanofibras uniformes (sem *beads*). Uma série de trabalhos relatam mudanças na arquitetura de nanofibras com o aumento da concentração polimérica, especialmente em relação ao formato dos *beads*, que mudam de redondo para elíptico, antes de alcançar a concentração ideal para obtenção de nanofibras uniformes. Este fenômeno reflete o processo de estiramento necessário à formação das fibras. Soluções com altas concentrações de

polímeros geralmente causam problemas processuais, e.g., solidificação e obstrução da agulha ou geração de fibras defeituosas (SHAMIM *et al.*, 2012; PILLAY *et al.*, 2013; ZONG *et al.*, 2002). Nossos resultados indicam que uma concentração de 10 ou 12% (m/v) é satisfatória para a obtenção de fibras de PCL e PCL/PEG uniformes.

O fluxo de infusão influencia a estabilidade do jato e a arquitetura das fibras, portanto, deve ser ajustado para permitir o seu estiramento e secagem antes que atinjam o coletor. Um alto fluxo pode causar uma grande amplitude no diâmetro, defeitos nas fibras como *beads*, fibras achatadas, aumento da porosidade e do diâmetro (MEGELSKI *et al.*, 2002, SHAMIM *et al.*, 2012). Neste trabalho, observou-se que o aumento do fluxo de 1 para 5 mL/h, causou aumento no diâmetro das fibras de 338 ± 189 para 507 ± 245 nm. O aumento adicional para 10 mL/h não impactou no diâmetro médio (536 ± 339 nm). Todavia, um excesso de solução polimérica deu origem à grandes *beads* e ao acúmulo de solução solidificada ao longo da matriz devido ao fluxo elevado, confirmando os efeitos relatados nos trabalhos acima citados.

A força eletrostática do campo elétrico é a força principal para originar o jato e a instabilidade de torção responsável pela redução do diâmetro das fibras para a escala nanométrica e a sua característica randomizada. A densidade de carga da solução polimérica também contribui fundamentalmente na formação do jato e da sua trajetória. A densidade de carga total tem seu valor máximo na extremidade do cone de Taylor e diminui ao se aproximar do coletor, quando forças aerodinâmicas e inércia se tornam relevantes. Assim, alterações no campo elétrico ou no coletor podem mudar a trajetória do jato e conseqüentemente a arquitetura das fibras (SAHAY, THAVASI & RAMAKRISHNA, 2011). Portanto, a configuração do equipamento é determinante nas características das fibras. Modificações no equipamento são úteis para manipular a arquitetura macro e microscópica das fibras visando uma dada aplicação, otimizar a produção e estudar os fenômenos envolvidos no processo de ES. Estas modificações podem ser feitas na fonte de alta voltagem, no sistema para dispensar a solução (bomba de infusão, seringa e agulha) e no coletor, usualmente constituídos por uma placa metálica ou um tambor rotatório com velocidade ajustável. Nanofibras randomizadas podem ser obtidas através do uso de placas ou coletores de tambor ajustados com baixa velocidade de rotação. O aumento da velocidade de rotação ocasiona o alinhamento das fibras e redução do diâmetro devido à alta força de estiramento causada pelo movimento do coletor durante a deposição das fibras (SAHAY, THAVASI & RAMAKRISHNA, 2011).

Neste trabalho, a obtenção de nanofibras alinhadas utilizou dois sistemas coletores: o tradicional coletor rotatório e um sistema de fios de cobre. Através do coletor giratório foi possível obter nano e microfibras randomizadas, aplicando uma baixa velocidade de rotação, e promover a redução do diâmetro e alinhamento com o aumento da velocidade. Este resultado demonstra o impacto do aumento da força de estiramento na arquitetura das fibras de PCL.

Alternativamente, a utilização de cabos de cobre posicionados paralelamente como coletor resultou na deposição de nanofibras alinhadas entre cabos. Este alinhamento deve-se à atração eletrostática do jato polimérico carregado pelos cabos condutores. Após a deposição de 1 ml de solução polimérica, um novo padrão de fibras foi obtido. Como previamente reportado (SAHAY, THAVASI & RAMAKRISHNA, 2011), as primeiras camadas de nanofibras depositadas exercem um efeito isolante no coletor, o que resulta numa mudança na distribuição das cargas eletrostáticas que influencia na característica das fibras. Este efeito foi observado neste trabalho e resultou numa matriz constituída com um triplo padrão de fibras caracterizados pela presença de feixes de fibras alinhadas (alta intensidade de campo elétrico), nanofibras retilíneas não alinhadas (intermediária intensidade de campo elétrico) e nanofibras curvilíneas (baixa intensidade de campo elétrico). Estes feixes de fibras podem ser explorados para aumentar a resistência mecânica em compósitos e *scaffolds* para a engenharia de tecidos (ABBASIPOUR & KHAJAVI, 2013).

Nas condições avaliadas, não foi obtido um alinhamento perfeito das fibras, o que resulta de fenômenos inerente ao processo como a instabilidade de torção e forças aerodinâmicas geradas pelo movimento do coletor. Entretanto, um padrão satisfatório de alinhamento foi obtido com ambos os coletores. Devido ao maior rendimento e melhor alinhamento, consideramos o coletor rotatório ajustado à 2000 rpm o método de escolha para a produção de nanofibras alinhadas.

Scaffolds tubulares são essenciais à engenharia de nervos e vasos e sanguíneos (YANG *et al.*, 2005; VATANKHAH *et al.*, 2014). Utilizando um sistema de mandril giratório, observou-se a deposição de fibras paralelamente ao coletor e fibras fusionadas depositadas perpendicularmente ao mandril. Este padrão reflete a influência da atração eletrostática das fibras pelo metal condutor e a força de estiramento causada pela rotação. Além disso, um fluxo de infusão excessivo pode ter ocasionado a fusão das fibras.

Os resultados do estudo de otimização permitiram compreender os fenômenos envolvidos no processo de *electrospinning*, padronizar a

técnica, gerar nanofibras uniformes randomizadas e nanofibras alinhadas e obter um *scaffold* tubular.

5.2. Influência do PEG em nanofibras de PLC

No presente trabalho, a influência da concentração e do peso molecular do PEG nas características de nanofibras de PCL/PEG foi avaliada. Blendas de destes polímeros foram previamente exploradas para obtenção de nanofibras (HUANG *et al.*, 2006; CHENG, LEI & GUO, 2006). Nano e microfibras randomizadas e homogêneas foram obtidas na maioria das matrizes. Entretanto, fibras fusionadas e aglomeradas foram observadas apenas na matriz constituída de PCL/PEG 400 (10: 1, m/m). Este efeito foi atribuído à separação de fases causada por uma possível incompatibilidade entre os polímeros nas condições avaliadas. Estes resultados sugerem que a compatibilidade entre PCL e PEG é influenciada pelo peso molecular e aumenta com o aumento da cadeia polimérica, conforme sugerido por LIU e colaboradores (2011).

O PEG é utilizado como plastificante na área farmacêutica. Plastificantes são aplicados para aumentar a tenacidade e conferir flexibilidade de outros polímeros de maneira a melhorar a sua processabilidade. Plastificantes são classificados como internos ou externos; os plastificantes internos reagem com o polímero original produzindo co-polímeros com menor cristalinidade e temperatura de transição vítrea, enquanto que os plastificantes externos interagem com a cadeia polimérica do polímero original através de forças moleculares internas, tais como, forças de dispersão, forças de indução, ligações de hidrogênio e interação dipolo-dipolo. A presença de um plastificante pode aumentar a flexibilidade, reduzir o módulo elástico e a resistência à tração dos materiais devido ao aumento da separação intermolecular e da mobilidade entre as cadeias poliméricas (GHEBREMESKEL, VEMAVARAPU & LODAYA, 2007; ZHU *et al.*, 2002; BAIARDO *et al.*, 2003; MEKONNEN *et al.*, 2013).

Neste estudo, foi avaliada a influência do PEG na morfologia e nas propriedades mecânicas de nanofibras de PCL. De maneira geral, a adição de PEG na solução de PCL deu origem a fibras com menor distribuição e diâmetro médio. Este resultado está associado ao aumento da capacidade de alongamento das fibras causado pelo efeito plastificante daquele polímero. YOON e colaboradores (2013) relatam uma diminuição no diâmetro de fibras de PLA causado pelo efeito plastificante do PEG, o que corrobora com nossos resultados. Durante o processo de formação

das fibras, o PEG agiu com um plastificante externo e aumentou a flexibilidade da cadeia molecular do PCL, resultando em maior instabilidade de torção e capacidade de alongamento das fibras. Além disso, observou-se que a adição de PEG nas nanofibras de PCL reduziu de forma expressiva a formação de *beads* (dados não mostrados), o que também foi atribuído ao efeito plastificante do PEG. Dessa forma, com a mesma força de estiramento gerada pelo campo elétrico e pela velocidade de rotação, fibras de PCL contendo PEG apresentaram um menor diâmetro. Este efeito também teve um impacto direto na resistência mecânica das fibras, como discutido abaixo.

As propriedades mecânicas de nanofibras dependem do seu tamanho e distribuição, arranjo geométrico, porosidade, diâmetro, cristalinidade e interações moleculares entre as fibras (WEI *et al.*, 2009, WAN *et al.*, 2015). Neste trabalho, ensaios de tração uniaxial foram realizados para avaliar o efeito do PEG nas propriedades mecânicas de nanofibras compostas de PCL/PEG. A adição de PEG 400 e 1500 (10%) causou um aumento no módulo de Young, o que indica uma maior rigidez destas matrizes. Adicionalmente, a presença de PEG (5% e 10%) nas nanofibras de PCL reduziu significativamente a tensão a ruptura e a porcentagem de alongamento, e diminuição da resistência destes materiais. Estes resultados podem ser atribuídos à redução das forças intermoleculares das cadeias poliméricas do PCL causada pela presença do plastificante (PEG), como previamente demonstrado com outros sistemas poliméricos (IFUKUA *et al.*, 2014). Além disso, a redução do diâmetro das fibras também pode ter originado fibras mais frágeis e contribuído para a redução das propriedades mecânicas das matrizes híbridas.

5.1 Avaliação das matrizes de PCL e PCL/PEG como suportes (*scaffolds*) para cultura celular e sistema de liberação de NGF

O requerimento básico para os materiais serem usados como *scaffolds* em engenharia de tecidos e dispositivos médicos é a sua biocompatibilidade. O PCL é um poliéster biodegradável e biocompatível considerado seguro ao uso parenteral em humanos. O PEG é um polímero biocompatível utilizado para retardar o *clearance*, ou depuração renal, e aumentar a biodisponibilidade de determinados medicamentos (VERONESE & MERO, 2008). Aqui, foram avaliadas a citotoxicidade de matrizes de PCL e PCL/PEG utilizando fibroblastos L929 através do MTT e do ensaio de sobreposição sobre o gel de agarose. Nenhum dos materiais avaliados apresentou citotoxicidade consoante às metodologias

empregadas, indicando que o processo de produção e a subsequente secagem a vácuo não deixaram resíduos de solvente.

Uma importante característica do ES é a sua versatilidade, que permite projetar as fibras direcionadas a uma dada aplicação. Neste sentido, estudos prévios provaram que o alinhamento influencia o direcionamento de neuritos de células neuronais diferenciadas. Por consequência, a aplicação de nanofibras alinhadas tem sido proposta para a regeneração axonal através de guias de nervos (ZHONG *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2009; NEAL *et al.*, 2014; TIAN *et al.*, 2016). Utilizando um coletor rotatório ajustado à 2000 rpm e um baixo fluxo de infusão, nanofibras com um satisfatório grau de alinhamento foram produzidas. Para avaliar a influência destes materiais no alinhamento de neuritos, células PC12 foram cultivadas sobre as matrizes em presença e ausência de NGF. Nossos resultados confirmam que o alinhamento das fibras induz ao alinhamento e direcionamento de neuritos, paralelamente às fibras.

Fatores neurotróficos como o NGF possuem efeitos benéficos para a manutenção da viabilidade de células nervosas. Por este motivo, é amplamente empregado em regeneração de nervos (LORENTZ *et al.*, 2007). A incorporação deste fator de crescimento em *scaffolds* poliméricos para geração de novos sistemas de liberação prolongado e guias de nervos é altamente atrativa. Entretanto, durante o processo produtivo, a bioatividade destas moléculas biológicas é comprometida pelas condições do processo de ES, como a temperatura, pH, contato com solventes orgânicos e campo elétrico. Apesar de uma quantidade pequena de NGF ser suficiente para sua atividade, o seu excesso pode causar efeitos indesejáveis (PFISTER *et al.*, 2007; PFISTER *et al.*, 2008). Portanto, é necessário o desenvolvimento de alternativas para o controle adequando da cinética de liberação do NGF ao longo do processo regenerativo (YU *et al.*, 2014).

Para avaliar a bioatividade do NGF liberado dos *scaffolds* de PCL e PCL/PEG, a porcentagem de células diferenciadas cultivadas com o meio extrator foi calculada para os diferentes períodos de tempo avaliados. Nossos resultados demonstram que a bioatividade do NGF foi preservada em todas as matrizes avaliadas, contudo, em presença de PEG, houve uma diminuição da liberação inicial (*burst release*) e uma ação prolongada do NGF durante 28 dias, com uma maior porcentagem de células diferenciadas nos primeiros 14 dias de avaliação. Este efeito foi mais pronunciado para o PEG de maior peso molecular (35 kDa), o que sugere que este polímero influencia de forma positiva a cinética de liberação de NGF das matrizes. De acordo com estes resultados, foi previamente demonstrado o efeito do PEG em aumentar a estabilidade de

moléculas biológicas (PÉAN et al., 1999). Além disso, a cinética de liberação do NGF foi controlada pelo peso molecular do PEG, sendo que o aumento do peso molecular diminui a liberação inicial e prolonga a ação destas substâncias. Este efeito também foi observado em nanofibras produzidas pelo método coaxial, constituídas por um núcleo contendo PEG e a substância bioativa, e uma camada externa de PCL (LIAO, CHEW & LEONG, 2006; YU et al., 2014). Entretanto, o método coaxial apresenta uma maior complexidade devido à necessidade de um sistema com dois capilares. Neste trabalho, foi utilizado o método tradicional de ES e um efeito similar foi demonstrado para a cinética de liberação de NGF.

Um fator importante para a regeneração de nervos periféricos é a disponibilidade de forma sustentada de fatores neurotróficos no local da lesão (PFISTER et al., 2008). Este estímulo tem uma maior importância nos primeiros 15 dias após a lesão, tendo em vista que neste período os neuritos atingem o guia de nervos e, em aproximadamente 30 dias crescem 1 cm, considerando lesões de nervo ciático de rato (DE BOER et al., 2010, ZHU et al., 2015). Desta forma, o sistema desenvolvido neste trabalho apresenta uma alternativa para o tratamento deste tipo de lesão.

Apesar do grande número de publicações relacionadas à aplicação de nanofibras em engenharia de tecidos, são escassos os trabalhos que avaliam os *scaffolds* após o período de estudo. Aqui, avaliamos novamente as matrizes após os 28 dias de exposição ao RPMI para verificação da arquitetura e da perda de massa após a lixiviação do PEG e do NGF. Os resultados obtidos mostram que houve uma redução no diâmetro médio para todas as amostras contendo PEG. A análise de frequência de distribuição de diâmetro mostra que esta redução foi inversamente proporcional ao peso molecular do PEG. Enquanto que a perda de massa foi menor com o aumento do peso molecular. Estes resultados sugerem que o PEG pode aumentar a biodegradabilidade das matrizes, especialmente para as amostras com PEG de baixo peso molecular. Enquanto que longas moléculas de PEG (38 kDa) tem uma maior interação e são mais fortemente retidas pelo PCL. Estas características também têm influência na liberação do NGF, como demonstrado. Pode-se ainda pressupor que o PEG se concentrou nas camadas mais externas das nanofibras e, após a lixiviação, nanofibras de PCL com diâmetro reduzido foram obtidas.

Portanto, a incorporação de PEG 38 kDa em nanofibras de PCL demonstrou ter o melhor efeito na cinética de liberação de NGF, devido à capacidade de reduzir a liberação inicial (*burst release*) e prolongar a sua liberação. Com vista nestes resultados, foi produzido um *scaffold*

tubular constituído de nanofibras alinhadas de PCL na camada interna (lúmen), e nanofibras randomizadas de PCL/PEG de 38 kDa contendo NGF. Este material demonstrou promover a diferenciação celular de células PC12, o que pode ser atribuído ao NGF liberado ao longo do período de cultivo.

Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial de nanofibras de PCL/PEG obtidas por *electrospinning* como *scaffolds* em estudos de cultura celular e como sistema de liberação de NGF. Além disso, apontam para uma possível aplicação em regeneração de nervos periféricos.

6. CONCLUSÕES

- A otimização do processo de ES permitiu a obtenção de fibras e nanofibras uniformes de PCL.

- O estudo das variáveis processuais permitiu compreender os fenômenos envolvidos no processo de ES e obter fibras com diferentes padrões de arranjo.

- A exploração de sistemas coletores permitiu a obtenção de nanofibras randomizadas e alinhadas, um *scaffold* tubular, além de um novo padrão de fibras, caracterizado pela presença de feixes de fibras dispostas ao longo da matriz.

- A influência do PEG em nanofibras de PCL foi demonstrada. O PEG atua como um plastificante e tem significativa influência na arquitetura, redução da formação de *beads*, diâmetro e nas propriedades mecânicas de nanofibras.

- Os estudos de citotoxicidade demonstraram que os compósitos de PCL/PEG não apresentam efeito citotóxico para fibroblastos L929.

- Nanofibras alinhadas demonstraram influenciar a morfologia celular e promover o direcionamento de neuritos de células PC12.

- A co-liofilização de NGF e PEG previamente à produção de nanofibras de PCL promoveu a diferenciação celular de células PC12 por um período de tempo prolongado.

- O PEG influenciou na degradabilidade de nanofibras de PCL de forma dependente do peso molecular. Desta forma, conclui-se que o PEG pode ser utilizado para controlar o tempo de biodegradação de *scaffolds*.

- A produção de um novo dispositivo tubular, constituído por nanofibras alinhadas de PCL no interior e randomizadas de PCL/PEG 38 kDa contendo NGF no exterior, promoveu a diferenciação celular de células PC12.

Em suma, evidencia-se a versatilidade da tecnologia de ES à obtenção de novos padrões de *scaffolds* constituídos de nanofibras. Diferentes padrões de fibras e nanofibras poliméricas podem ser obtidos através da modificação do design do sistema coletor. Para o coletor rotatório, o aumento da velocidade de rotação acarreta no aumento da força de estiramento, no alinhamento e redução do diâmetro das fibras. No coletor de cabos paralelos, a força eletrostática causa o estiramento, alinhamento e a deposição de fibras perpendicularmente aos cabos. A deposição das fibras sobre os cabos provoca o isolamento do coletor, o que causa uma redistribuição das forças eletrostáticas e conseqüentemente uma modificação do padrão de fibras, caracterizado pela presença de feixes de fibras depositadas ao longo da matriz. O coletor de mandril permite a obtenção de *scaffolds* tubulares, estruturas que

apresentam grande potencial de aplicação em engenharia de nervos e vasos. Neste coletor, a arquitetura das fibras é influenciada pela velocidade de rotação do mandril e pela atração eletrostática das fibras pelo metal do mandril. Desta forma, a exploração dos parâmetros processuais e da arquitetura de coletor constitui uma ferramenta para a obtenção de padrões de fibras direcionados a aplicações específicas como, por exemplo, cultura celular e medicina regenerativa.

Os estudos realizados com blendas de PEG e PCL para obtenção de nanofibras evidenciou o efeito plastificante do PEG, atuando na redução do diâmetro e alteração das propriedades mecânicas das fibras. A utilização do PEG em blendas com PCL também demonstrou controlar a cinética de liberação de NGF e a degradabilidade dos *scaffolds*. Portanto, podemos concluir que estes sistemas apresentam grande potencial de aplicação em estudos de cultura celular e apontam para uma possível aplicação em regeneração de nervos periféricos.

Como resultados adicionais, o presente trabalho contribuiu para a implementação e padronização da tecnologia de ES no NanoBioMat (*Bioactive Nanofibers for Natural Compounds Delivery*) do Laboratório de Morfogêne e Bioquímica Vegetal (LMBV) da UFSC e a abertura de uma *spin-off* na área de nano(bio)tecnologia denominada **Nanoscopying - soluções em nanotecnologia LTDA**, vencedora do prêmio Sinapse da Inovação, FAPESC, no ano de 2014. Em 2016 foi acelerada pelo Inovativa Brasil e pelo INAM (Innovation Network for Advanced Materials) em parceria com a Universidade de Humboldt e a rede Berlin Partners, na Alemanha.

7. REFERÊNCIAS

ABBASIPOUR, M. & KHAJAVI, R. Nanofiber bundles and yarns production by electrospinning: a review. **Advances in Polymer Technology**, v. 32, p. 1-9, 2013.

AGTHONG, S., KAEWSEMA, A., TANOMSRIDEJCHAI, N., CHENTANEZ, V. Activation of MAPK ERK in peripheral nerve after injury. **BMC Neuroscience**, v. 8, p. 45-49, 2006.

AHMED, M.R., VAIRAMUTHU, S., SHAFIUZAMA, M., BASHA, S.H., JAYAKUMAR, R. Microwave irradiated collagen tubes as a better matrix for peripheral nerve regeneration. **Brain Research**, v. 1046, p. 55-67, 2005.

ALLODI, I., UDINA, E., NAVARRO, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**, vol. 98, p. 16-37, 2012.

ANGAMMANA, C.J. & JAYARAM, S.H. Analysis of the effects of solution conductivity on electrospinning process and fiber morphology. **IEEE Industry Applications Society**, v. 47, p. 1109-1117, 2011.

ARCHIBALD, S., KRARUP, C., SHEFNER, J., LI, S., MADISON, R. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. **Journal of Comparative Neurology**, v. 306, p. 685-96, 1991.

ARSLANTUNALI, D., DURSUN, T., YUCEL, D., HASIRCI, N., HASIRCI, V. Peripheral nerve conduits: technology update. **Medical Devices and Research**, v. 7, p. 405-424, 2014.

ARTHUR-FARRAJ, P.J., LATOUCHE, M., WILTON, D.K., QUINTES, S., CHABROL, E., BANERJEE, A., WOODHOO, A., JENKINS, B., RAHMAN, M., TURMAINE, M., WICHER, G.K., MITTER, R., GREENSMITH, L., BEHRENS, A., RAIVICH, G., MIRSKY, R., JESSEN, K.R. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. **Neuron**, v. 75, p. 633-647, 2012.

BAIARDO, M., FRISONI, G., SCANDOLA, M., RIMELEN, M., LIPS, D., RUFFIEUX, K. Thermal and mechanical properties of plasticized

poly(lactic acid). **Journal of Applied Polymer Sciences**, v. 90, p. 1731-1738, 2003.

BALGUID, A., MOL, A., VAN, MARION, M.H., BANK, R.A., BOUTEN, C.V.C., BAAIJENS, F.P.T. Tailoring fiber diameter in electrospun poly(epsilon-caprolactone) scaffolds for optimal cellular infiltration in cardiovascular tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, p. 437-444, 2009.

BAPTISTA, A. F. et al. A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse - adaptation of the sciatic static index. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 161, p. 259-64, 2007.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1988.

BHARDWAJ, N. & KUNDU, S.C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325-347, 2010.

BITTNER, G.D., BALLINGER, M.L., RAYMOND, M.A. Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol. **Brain Research**, v. 367, p. 351-365, 1986.

BODINE-FOWLER, S.C., MEYER, R.S., MOSKOVITZ, A., ABRAMS, R., BOTTE, M.J. Inaccurate projection of rat soleus motoneurons: a comparison of nerve repair techniques. **Muscle and Nerve**. v. 20, p. 29-37, 1997.

BOLGEN, N., MENCELOGLU, Y.Z., ACATAY, K., VARGEL, I., PISKIN, E. In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(e-caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. **Journal of Biomaterials Science Polymer**, v.16, p. 1537-1555, 2005.

BUNGE, M.B., WILLIAMS, A.K., WOOD, P.M. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. **Developmental Biology**, v. 92, p. 449-460, 1982.

BORGENS, R., SHI, R. Immediate recovery from spinal cord injury through molecular repair of nerve membranes with polyethylene glycol. **FASEB**, v. 14, p. 27–35, 2000.

BOSTMAN, O., HIRVENSALO, E., MAKINEN, J., ROKKANEN, P. Foreign-body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 72, p. 592–596, 1990.

BRASIL. Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

BRIDGE, P.M. et al. Nerve crush injuries - a model for axonotmesis. **Experimental Neurology**. v. 127, p. 284-290. 1994.

BRUNELLI GA, BATTISON B, VIGASIO A, BRUNELLI G, MAROCOLO D. Bridging nerve defects with combined skeletal muscle and vein conduits. **Microsurgery**, v. 14, p. 247–51, 1993

CARGNIN-FERREIRA, E., SARASQUETE, C. **Histofisiología de Moluscos Bivalvos Marinos**. Madrid: CSIC, 2008.

CHANDRA R, RUSTGI R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CHENG, L., LEI, L. & GUO, S. In vitro and in vivo evaluation of praziquantel loaded implants based on PEG/PCL blends. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, p. 129–138. 2010.

CHEW, S.Y., MIC, R., HOKEC, A., LEONGE, K.W. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. **Biomaterials**, v. 29, p. 653–661, 2008.

CHHABRA, A., AHLAWAT, S., BELZBERG, A., ANDRESEIK, G. Peripheral nerve injury grading simplified on MR neurography: As referenced to Seddon and Sunderland classifications. **Indian Journal of Radiology and Imaging**, v. 24, p. 217-24, 2014.

CHIU, D.T.W., JANECKER, I., KRIZCK, T.J. Autogenous vein graft as a conduit for nerve regeneration. **Surgery**, v. 91, p. 226–33, 1982.

CHEW, S.Y., WEN, J., YIM, E.K.F., LEONG, K.W. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2017-2024, 2005.

CHOI, J.S., LEE, S.W., JEONG, L., BAE, S-H., MIN, B.C., YOUK, J.H., PARK, W.H. Effect of organosoluble salts on the nanofibrous structure of electrospun poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **International Journal of Biology and Macromolecules**, v. 34, p. 249-256, 2004.

COLUMBUS, S., KRISHNAN, L.K., KRISHNAN, V.K. Relating pore size variation of poly (ϵ -caprolactone) scaffolds to molecular weight of porogen and evaluation of scaffold properties after degradation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. v. 102 B, p. 789–796, 2014.

COOLEY, J.F., INVENTOR; EASTMAN, A., Charles S FARQUHAR, C.S., CESSIÓARIO. Apparatus for electrically dispersing fluids. US 692631 A. 1902 FEV.4

CRAGG, B.G. What is the signal for chromatolysis? **Brain Research**, v. 23, p. 1–21, 1970.

DALY, W., YAO, L., ZEUGOLIS, D., WINDEBANK, A., PANDIT, A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. **Interface**, v. 9, p. 202–221, 2012.

DEL GAUDIO C, BIANCO A, FOLIN M, BAIGUERA S, GRIGIONI M. Structural characterization and cell response evaluation of electrospun PCL membranes: micrometric versus submicrometric fibers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89A, p. 1028-39, 2009.

DELLON, A.L., MACKINNON, S.E. An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 82, p. 849–856, 1988.

DE RUITER, G.C.W., MALESSY, M.J.A., YASZEMSKI, M.J., WINDEBANK, A.J., SPINNER, R.J. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. **Neurosurgery Focus**, v. 26, p. 1-12, 2010.

DEITZEL, J.M., KLEINMEYER, J., HARRIS, D., TAN, N.C.B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, p. 261-72, 2001.

DIJKSTRA, J. R. et al. Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 96, p. 89-96, 2000.

DOSHI J. & RENEKER, D.H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, p. 151-160, 1995.

FENNESSEY, S.F., FARRIS, R.J. Fabrication of aligned and molecularly oriented electrospun polyacrylonitrile nanofibers and the mechanical behavior of their twisted yarns. **Polymer**, v. 45, p. 4217-4225, 2004.

FONG, H., CHUN, I., RENEKER, D.H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, p. 4585-4592, 1999.

FONTANA, X., HRISTOVA, M., DA COSTA, C., PATODIA, S., THEI, L., MAKWANA, M., SPENCER-DENE, B., LATOUCHE, M., MIRSKY, R., JESSEN, K.R., KLEIN, R., RAIVICH, G., BEHRENS, A. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. **The Journal of Cell Biology**, v.198, p. 127-141, 2012.

FORMHALS, A., INVENTOR; FORMHALS, A., RICHARD, S.G., CESSIONÁRIO. Process and apparatus for preparing artificial threads. United States patent US 1975504 A. 1934 OCT 2.

FREIBERG, S., ZHU, X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1-18, 2004.

GARG, K. & BOWLIN, G. L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. **Biomicrofluidics**, v. 5, p. 1932-1058, 2011.

GERTZ, C.C., LEACH, M.K., BIRRELL, L.K., MARTIN, D.C., FELDMAN, E.L., COREY, J.M. Accelerated neuritogenesis and maturation of primary spinal motor neurons in response to nanofibers. **Developmental Neurobiology**. v. 70, p. 589-603, 2010.

GEUNA, S., RAIMONDO, S., RONCHI, G., F., P., CZAJA, K., FORNARO, M. Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. **International Review of Neurobiology**, v. 87, p. 27–46, 2009.

GHEBREMESKEL, A.N., VEMAVARAPU, C., LODAYA, M. Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: Selection of polymer–surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p.119-129, 2007.

GOLD, B. Axonal regeneration of sensory nerves is delayed by continuous intrathecal infusion of nerve growth factor. **Neuroscience**, v. 76, p. 1153–1158, 1997.

GUARINO, V., CAUSA, F., TADDEI, P., DI FOGGIA, M., CIAPETTI, G., MARTINI, D., FAGNANO, C., BALDINI, N., AMBROSIO, L. Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 3662-3670, 2008.

FORMHALS, A., INVENTOR; FORMHALS, A. RICHARD, S.G. Process and apparatus for preparing artificial threads. United States patent US 1975504 A. 1934 OCT 2.

FUJITANI, M., KAWAI, H., PROIA, R.L., KASHIWAGI, A., YASUDA, H., YAMASHITA, T. Binding of soluble myelin-associated glycoprotein to specific gangliosides induces the association of p75NTR to lipid rafts and signal transduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, p. 15–21, 2005.

HANZ, S., PERLSON, E., WILLIS, D., ZHENG, J.Q., MASSARWA, R., HUERTA, J.J., KOLTZENBURG, M., KOHLER, M., VAN-MINNEN, J., TWISS, J.L., FAINZILBER, M. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. **Neuron**, v. 40, p. 1095–1104, 2003.

HAYASHI T. Biodegradable polymers for biomedical uses. **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 663-702, 1994.

HORCH, K.W., LISNEY, S.J.W. On the number and nature of regenerating myelinated axons after lesions of cutaneous nerves in the cat. **Journal of Physiology**, v. 313, p. 275–286, 1981.

HUANG, M.H., LI, S., HUTMACHER, D.W., COUDANE, J., VER, M. Degradation characteristics of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers and blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, p. 1681–1687, 2006.

HUBER, A.B., KOLODKIN, A.L., GINTY, D.D., CLOUTIER, J.F. Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. **Annual Review of Neuroscience** v. 26, p. 509–563, 2003.

HUDSON, T.W., LIU, S.Y., SCHMIDT, C.E. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. **Tissue Engineering**, v. 10, p. 1346–58, 2004.

HUDSON, T.W., EVANS, G.R.D., Schmidt, C.E. Engineering strategies for peripheral nerve repair. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 31, p. 485–498, 2000.

ICHIHARA, S., INADA, Y., NAKAMURA, T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. **Injury**, v. 39, p. 29–39, 2008.

IFUKUA, S., IKUTAA, A., IZAWAA, H., MORIMOTOB, M., SAIMOTOA, H. Control of mechanical properties of chitin nanofiber film using glycerol without losing its characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 714-717, 2014.

IJPMA, F. F. A., VANDE GRAAF, R. C., MEEK M. F. The early history of tubulation in nerve repair. **The Journal of Hand Surgery**, v. 33, p. 581–586, 2008.

INSERRA, M. M. et al. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery**, v. 18, p. 119-24, 1998.

JANSEN, K., MEEK, M.F., VAN DER WERFF, J.F.A., VAN WACHEM, P.B., VAN LUYN, M.J.A. Long-term regeneration of the rat sciatic nerve through a biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide: tissue reactions with focus on collagen III/IV reformation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 69A, p. 334–341, 2004.

JARUSUWANNAPOOM, T., HONGROJJANAWIWAT, W., JITJAICHAM, S., WANNATONG, L., NITHITANAKUL, M., PATTAMAPROM, C., KOOMBHONGSE, P., RANGKUPAN, R., SUPAPHOL, P. Effect of solvents on electrospinnability of polystyrene solutions and morphological appearance of resulting electrospun polystyrene fibers. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 409-421, 2005.

JEONG, S.I., KWON, J.H., LIM, J.I., CHO, S.W., JUNG, Y.M., SUNG, W.J., SOO, KIM, H., KIM, Y.H., LEE, Y.M., KIM, B-S., CHOI, C.Y., KIM, S-J. Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, p. 1405-1411, 2005.

JESSEN, K.R., MIRSKY, R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. **Glia**, v. 56, p. 1552–1565, 2008.

JOHNSON, P.J., SKORNIA, S.L., STABENFELDT, S.E., WILLITS, R.K.. Maintaining bioactivity of NGF for controlled release from PLGA using PEG. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 86A, p. 420–427, 2008.

KATTA, P., ALESSANDRO, M., RAMSIER, R. D., CHASE, G. G. Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector. **Nano Letters**, vol. 4, p. 2215-2218, 2004.

KAZIMOGLU, C., BOLUKABSI, S., KANATLI, U., SENKOYLU, A., ALTUN, N.S., BABAC, C., YAVUZ, H., PIŞKIN, E. A novel biodegradable PCL film for tendon reconstruction: achilles tendon defect model in rats. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 26, p. 804-812, 2003.

KEHL, L. J. et al. A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 333-43, 2000.

KI, C.S., BAEK, D.H., GANG, K.D., LEE, K.H., UM, I.C., PARK, Y.H. Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. **Polymer**, v. 46, p.5094–5102, 2005.

KHOURI, R.K., CHIU, D.T., FEINBERG, J., TARK, K.C., HARPER, A., SPIELHOLZ, N. Effects of neuritepromoting factors on rat sciatic nerve regeneration. **Microsurgery**, v. 10, p. 206–209, 1989.

KEHOE, S., ZHANG, X.F., BOYD, D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. **Injury**, v. 43, p. 553–572, 2012.

KIERNAN, J. A. **Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice**. London: Butterworth-Heinemann, 2004.

KRAUSE, T.L., BITTNER, G.D. Rapid morphological fusion of severed myelinated axons by polyethylene glycol. **PNAS**, v. 87, p. 1471–1475, 1990.

KUIHUA Z., WANG CHUNYANG, W., CUNYI, F., XIUMEI, M., Aligned SF=P(LLA-CL)-blended nanofibers encapsulating nerve growth factor for peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 00A, p. 1-12, 2013.

LAIVA A. L., VENUGOPAL, J.R., SRIDHAR, S., RANGARAJAN, B., NAVANEETHAN, B., RAMAKRISHNA, S. Novel and simple methodology to fabricate porous and buckled fibrous structures for biomedical applications. **Polymer**, v. 55, p. 5837-5842, 2014.

LAM, C.X.F., HUTMACHER, D.W., SCHANTZ, J-T., WOODRUFF, M.A., TEOH, S.H. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 19, p. 906-919, 2008.

LEE, K.H., KIM, H.Y., KHIL, M.S., RA, Y.M., LEE, D.R. Characterization of nano-structured poly(1-caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. **Polymer**, v. 44, p. 1287-1294, 2003.

LI, W.J., TULI, R., OKAFOR, C., DERFOUL, A., DANIELSON, K.G., HALL, D.J., TUAN, R.S. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 26, p. 599-609, 2005.

LI, D., WANG, Y., XIA, Y. Electrospinning of polymeric and ceramic nanofibers as uniaxially aligned arrays. **Nano Letters**, v. 3, p. 1167-1171, 2003.

LIU, J-J., WANG, C-Y., WANG, J-G., RUAN, H-J., FAN, C-Y. Peripheral nerve regeneration using composite poly(lactic acid-caprolactone)/nerve growth factor conduits prepared by coaxial electrospinning. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 96, p. 13-20, 2011.

LIU, K.L., WIDJAJA, E., HUANG, Y., NG, X. W., LOO, S.C.J., BOEY, F.Y.C., VENKATRAMAN, S.S. A new insight for an old system: protein-PEG colocalization in relation to protein release from PCL/PEG blends, **Molecular Pharmaceutics**, v.8, p. 2173-2182, 2011.

LIU, Y., ZHANG, X., XIA, Y., YANG, H. Magnetic-field assisted electrospinning of aligned straight and wavy polymeric nanofibers, **Advanced Materials**, v. 22, p. 2454-2457, 2010.

LIAO, I-C; WAN, H.; QI, S.; CUI, C.; PATEL, P. SUN, W.; XU, H. Preclinical evaluations of a cellular biological conduits for peripheral nerve regeneration. **Journal of Tissue Engineering** v. 4, p. 1-10, 2013.

LOH, Q.L. & CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. **Tissue Engineering Part B Reviews**, 19, p. 485-502, 2013.

LORENTZ, A.; HOPPE, J.; WORTHMANN, H.; GEBHARDT, T.; HESSE, U.; BIENENSTOCK, J.; BISCHOFF, S.C. Neurotrophin-3, but not nerve growth factor, promotes survival of human intestinal mast cells. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 19, p. 301–308, 2007.

LOWERY, J.L., DATTA, N., RUTLEDGE, G.C. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. **Biomaterials**, v. 31, p. 491-504, 2010.

LU, W., SUN, J., JIANG, X., Recent advances in electrospinning technology and biomedical applications of electrospun fibers. **Journal of Materials Chemistry B**, v.2, p. 2369–2380, 2014.

LUSHNIKOV, A. Igor' Vasilievich Petryanov-Sokolov (1907–1996). **Journal of Aerosol Science**, v. 28, p. 545–546, 1997.

LUU, Y.K., KIM, K. HSIAO, B.S., CHU, B. HADJIARGYROU, M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. **Journal of Control Release**, v. 89, p. 341-353, 2003.

LUNDBORG, G., ROSEN, B., DAHLIN, L., DANIELSEN, N., HOLMBERG, J. Tubular versus conventional repair of median and ulnar nerves in the human forearm: early results from a prospective, randomized, clinical study. **Journal of Hand Surgery**, v. 22, p. 99–106, 1997.

LUNDBORG, G., ROSEN, B., DAHLIN, L., HOLMBERG, J., ROSEN, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **Journal of Hand Surgery**, v. 29, p. 100–107, 2004.

KARANDE, T.S., ONG, J.L., AGRAWAL, C.M. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: design issues related to porosity, permeability, architecture and nutrient mixing. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 32, p. 1728–1743, 2004.

KLOPP, L.S., SIMON, B.J., BUSH, J.M., ENNS, R.M., TURNER, A.S. Comparison of a caprolactone/lactide film (Mesofol) to two polylactide film products as a barrier to postoperative peridural adhesion in an ovine dorsal laminectomy model. **Spine**, v. 33, p. 1518-1526, 2008.

MACKINNON, S.E., DELLON, A.L. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 85, p. 419–24, 1990.

MANDOLESI, G., MADEDDU, F., BOZZI, Y., MAFFEI, L., RATTO, G.M. Acute physiological response of mammalian central neurons to axotomy: ionic regulation and electrical activity. **FASEB Journal**, v. 18, p. 1934–1936, 2004.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. Human anatomy and physiology. 7th ed. NEW YORK: Pearson Education, Inc., 2006.

MEKONNEN, T., MUSSONE, P., KHALIL, H., BRESSLER, D. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, p. 13379–13398, 2013.

MEEK, M.F. A prospective clinical evaluation of biodegradable neurolac nerve guides for sensory nerve repair in the hand. **The Journal of Hand Surgery**, v. 30, p. 513–518, 2005.

MEEK, M.F., JANSEN, K. Two years after in vivo implantation of poly(DL-lactideepsilon-caprolactone) nerve guides: Has the material finally resorbed? **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89A, p. 734–748, 2009.

MEEK, M.F., COERT, J.H. US Food and Drug Administration/Conformit Europe approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. **Annals of Plastic Surgery**, v. 60, p. 466–72, 2008.

MEGELSKI, S., STEPHENS, J.S., CHASE D.B., RABOLT, J.F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v. 35, p. 8456-8466, 2002.

MENDELSON, M.I. **Learning Bio-Micro-Nanotechnology**. CRC Press: New York, 2013.

MEECHASUE, C., DUBIN, R., SUPAPHOL, P., HOVEN, V.P., KOHN, J. Electrospun mat of tyrosine-derived polycarbonate fibers for potential use as tissue scaffolding material. **Journal of Biomaterial Science and Polymers**, v. 17, p. 1039-56, 2006.

MENORCA, R.M., FUSSEL, T.S., ELFAR, J.C. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. **Hand Clinics**, v. 29, p. 317-330, 2013.

MERLE, M., DELLON, A.L., CAMPBELL, J.N., CHANG, P.S. Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. **Microsurgery**. v. 10, p.130–133, 1989.

MICHALSKI, B., BAIN, J.R., FAHNESTOCK, M., 2008. Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 1244–1252, 2008.

MIDDLETON, J.C, TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v.21, p. 2335-2346, 2000.

MINER, M.R., BERZINS, D.W., BAHCALL, J.K. A comparison of thermal properties between gutta-percha and a synthetic polymer based root canal filling material (resilon). **Journal of Endodontics**, v. 31, p. 723-247, 2006.

MONDAL, D., GRIFFITH, M. & VENKATRAMAN, S.S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 65, p. 255-265, 2016.

MORITA T, HORIKIRI Y, SUZUKI T, YOSHINO H. Preparation of gelatin microparticles by co- lyophilization with poly(ethylene glycol): Characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 219, p. 127–137. 2001.

MORTIMER, D., FOTHERGILL, T., PUJIC, Z., RICHARDS, L.J., GOODHILL, G.J. Growth cone chemotaxis. **Trends in Neurosciences**, v. 31, p. 90–98. 2008.

MORTON, W.J., INVENTOR; MORTON, W.J., CESSIÓNÁRIO. Method of dispersing fluids. US705691 A. 1902 JUL 29.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63. 1983.

MOLANDER, C., ALDSKOGIUS, H. Directional specificity of regenerating primary sensory neurons after peripheral nerve crush or transection and epineurial suture A sequential double-labeling study in the rat. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 4, p. 339–344, 1992.

NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science** v. 32, p. 762–798, 2007.

NARAYAN, D., VENKATRAMAN, S.S. Effect of pore size and interpore distance on endothelial cell growth on polymers. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 87A, p. 710–718, 2008.

NEAL, R. A., LENZ, S. M., WANG, T., ABEBAYEHU, D., BROOKS, B. P.C., OGLE, R. C., BOTCHWEY, E. A. Laminin- and basement membrane-polycaprolactone blend nanofibers as a scaffold for regenerative medicine, **Nanomaterials and Environment**, v. 2, p. 1–12, 2014.

NEAL, R.A., THOLPADY, S.S., FOLEY, P.L., SWAMI, N., OGLE R.C., BOTCHWEY, E.A. Alignment and composition of laminin–polycaprolactone nanofiber blends enhance peripheral nerve regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 100A, p. 406-423, 2012.

NOTTELET, B., PEKTOK, E., MANDRACCHIA, D., TILLE, J.C., WALPOTH, B., GURNY, R., MOLLER, M. Factorial design optimization and in vivo feasibility of poly(ϵ -caprolactone)-micro- and nanofiber-based small diameter vascular grafts. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 89A, p 865-875, 2009.

O'BRIEN, K.A.F., JONES, P.A AND ROCKLEY, J. Evaluation of an agarose overlay assay to determine the eye irritation potential of detergent-based products. **Toxicology in Vitro**, v. 4, p. 311-313, 1990.

OH, S.H., KIM, J.H., SONG, K.S., JEON, B.H., YOON, J.H., SEO, T.B., NAMGUNG, U., LEE, I.W., LEE, J.H. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v. 29, p. 1601-1609, 2008.

OSHIMA, M., SITHANADAM, G., RAPP, U.R., AND GUROFF, G. The phosphorylation and activation of B-raf in PC12 cells stimulated by nerve growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 23753–23760, 1991.

PILLAY, V., DOTT, C., CHOONARA, Y.E., TYAGI, C., TOMAR, L., KUMAR, P., DU TOIT, L.C., NDESENDO, V.M.K. A review of the effect of processing variables on the fabrication of electrospun nanofibers for drug delivery applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 77, p. 1-22, 2013.

PFISTER, L.A.; ALTHER, E.; PAPALOÏZOS, M.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Controlled nerve growth factor release from multi-ply alginate/chitosan-based nerve conduits. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, p. 563–572, 2008.

PFISTER, L.A.; PAPALOÏZOS, M.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Nerve conduits and growth factor delivery in peripheral nerve repair. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v.12, p. 65–82. 2007

PITT, C.G., CHASALOW, F.I., HIBIONADA, Y.M., KLIMAS, D.M., SCHINDLER, A. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(epsilon-caprolactone) in vivo. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, p. 37790-3787, 1981.

PÉAN, J.M., BOURY, F. VENIER-JULIENNE, M.C., MENEI, P. PROUST, J.E., BENOIT, J.P. Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? **Pharmaceutical Research**, v. 16, p. 1294-1299, 1999.

PERSANO, L., CAMPOSEO, A., TEKMEŃ, C. AND PISIGNANO, D. Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 298, p. 504–520, 2013.

PLUNET, W., KWON, B.K., TETZLAFF, W. Promoting axonal regeneration in the central nervous system by enhancing the cell body response to axotomy. **Journal of Neuroscience Research**, v. 68, p. 1–6, 2002.

POWELL HM, BOYCE ST. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen–PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, p. 2177-2187, 2009.

PRABHAKARAN, M. P., VATANKHAH, E., RAMAKRISHNA S. Electrospun aligned PHBV/collagen nanofibers as substrates for nerve tissue engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 30, p. 1-10, 2013.

RAMAKRISHNA, S., FUJIHARA, K., TEO, W., YONG, T., MA, Z., RAMASESHAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. **Materials Today**, v. 9, p. 40-50, 2006.

RANKIN, S.L., GUY, C.S., RAHIMTULA, M., MEAROW, K.M. Neurotrophin-induced upregulation of p75NTR via a protein kinase C-delta-dependent mechanism. **Brain Research**, v. 1217, p. 10–24, 2008.

RANVIER, L. **Traité technique d'histologie**. A. Lahure: Paris, 1889.
RAIVICH, G., HELLWEG, R., KREUTZBERG, G.W. NGF receptor-mediated reduction in axonal NGF uptake and retrograde transport following sciatic nerve injury and during regeneration. **Neuron** v. 7, 151–164. 1991.

RENEKER, D.H. & YARIN, A.L. Electrospinning jets and polymer nanofibers. **Polymer**, v. 49, p. 2387-2425, 2008.

RENEKER, D. H., YARIN, A. L., FONG, H., KOOMBHONGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. **Journal of Applied Physics**, v. 87, p. 4531–4547, 2000.

RENEKER, D.H., CHUN, I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. **Nanotechnology**, v. 7, p.216–223, 1996.

REPANAS, A., WOLKERS, W.F., GRYSHKOV, O., MÜLLER, M., GLASMACHER, B. Pcl/Peg Electrospun Fibers as drug carriers for the controlled delivery of dipyridamole. **Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology**, v. 1, p. 1-10, 2015.

RICH, K.M., LUSZCZYNSKI, J.R., OSBORNE, P.A., JOHNSON JR., E.M. Nerve growth factor protects adult sensory neurons from cell death and atrophy caused by nerve injury. **Journal of Neurocytology**, v. 16, p. 261–268, 1987.

ROBINSON, L.R.; SPENSER STELFA, E.L. Diagnosis and rehabilitation of peripheral nerve injuries. In: Robinson LR (ed.) Trauma rehabilitation. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006.

ROHDE, R.S., WOLFE, S.W. Nerve transfers for adult traumatic brachial plexus palsy (brachial plexus nerve transfer). **HSS Journal**. v. 3, p. 77-82, 2007.

SANDERS, E.H., KLOEFKORN, R., BOWLIN, G.L., SIMPSON, D.G., WNEK, G.E. Two-phase electrospinning from a single electrified jet:

microencapsulation of aqueous reservoirs in poly(ethylene-co-vinyl acetate) fibers. **Macromolecules**, v. 36, p. 3803–3805, 2003.

SHAMIM, Z., SAEED, B., AMIR, T., SAIED, R.A., DAMERCHELY, R. The effect of flow rate on morphology and deposition area of electrospun nylon 6 nanofiber. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 7, p. 42-49, 2012.

SKENE, J.H., JACOBSON, R.D., SNIPES, G.J., MCGUIRE, C.B., NORDEN, J.J., FREEMAN, J.A. A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. **Science**, v. 233, p. 783-786, 1986.

STANG, F., FANSA, H., WOLF, G., KEILHOFF, G. Collagen nerve conduits – assessment of biocompatibility and axonal regeneration. **Bio-Medical Materials and Engineering**, v. 15, p. 3–12, 2005.

SAHAY, R., THAVASI, V., RAMAKRISHNA, S. Design modifications in electrospinning setup for advanced applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

SINHA, V.R., BANSAL, K., KAUSHIK, R., KUMRIA, R., TREHAN, A. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p 1-23, 2004.

STANG, F., KEILHOFF, G., FANSA, H. Biocompatibility of different nerve tubes. **Materials**, v. 2, p. 1480–1507, 2009.

STAVISKYA, R.C., BRITTA, J.M., ZUZEKA, A., TRUONGA, E., BITTNER, G.D. Melatonin enhances the in vitro and in vivo repair of severed rat sciatic axons. **Neuroscience Letters**, v. 376, p. 98–101, 2005.

STOLL, G., MULLER, H.W. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. **Brain Pathology**, v. 9, p. 313–325, 1999.

SILL, T.J. & VON RECUM, H.A. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989-2006, 2008.

SCHLOSSHAUER, B., DREESMANN, L., SCHALLER, H.E., SINIS, N. Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. **Neurosurgery**, v. 59, p. 740–7, 2006.

SEDDON, H.F. Three types of nerve injury. **Brain**, v. 66, p. 238-283, 1943.

SHERMAN, D.L., BROPHY, P.J. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 683-690, 2005.

SHIN, R.H., FRIEDRICH, P.F., CRUM, B.A., BISHOP, A.T., SHIN, A.Y. Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: a comparison of commercially available conduits. **Journal of Bone and Joint Surgery-American**, v. 91, p. 2194–204, 2009.

SKENE, J. Axonal growth-associated proteins. **Annual Review of Neuroscience**, v. 12, p. 127–156, 1989.

SRINIVASAN, G. & RENEKER, D.H. Structure and morphology of small diameter electrospun aramid fibers, **Polymer International**, v. 36, p. 195–201, 1995.

SUN, B., LONG, Y.Z., ZHANG, H.D., LI, M.M., DUVAIL, J.L., JIANG, X.Y., YIN, H.L. Advances in three-dimensional nanofibrous macrostructures via electrospinning. **Progress in Polymer Science**, p. 39, v. 862-890, 2014.

SUN, H., MEI, L., SONG, C., CUI, X., WANG, P. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, v. 27, p. 1735-1740, 2006.

SUNDERLAND, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. **Brain** v. 74, p. 491-516. 1951.

TANG, J.B. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, v. 11, p. 21–6, 1995.

TANG, B.L. Inhibitors of neuronal regeneration: mediators and signaling mechanisms. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 189–203, 2003.

TARAS, J.S., NANAVATI, V., STEELMAN, P. Nerve conduits. **Journal of Hand Therapy**, v. 18, p. 191–197, 2005.

TIAN, L., PRABHAKARAN, M. P., HU, J., CHEN, M., BESENBACHER, F., RAMAKRISHNA, S. Synergistic effect of topography, surface chemistry and conductivity of the electrospun nanofibrous scaffold on cellular response of PC12 cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 420–429, 2016.

TYNER, T.R., PARKS, N., FARIA, S., SIMONS, M., STAPP, B., CURTIS, B., et al. Effects of collagen nerve guide on neuroma formation and neuropathic pain in a rat model. **The American Journal of Surgery**, v. 193, p. 1–6, 2007.

WAN, L. Y., WANG, H., GAO, W., KO, F. An analysis of the tensile properties of nanofiber mats. **Polymer**, v. 73, p. 62–67, 2015.

WANG, H.B., MULLINS, M.E., CREGG, J.M., MCCARTHY, C.W., GILBERT, R.J. Varying the diameter of aligned electrospun fibers alters neurite outgrowth and Schwann cell migration. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2970–2978, 2010.

WANGENSTEEN, K.J., KALLIAINEN, L.K. Collagen tube conduits in peripheral nerve repair: a retrospective analysis. **Hand (NY)**, v. 5, p. 273–277, 2009.

WALDRAM, M. Peripheral nerve injuries. **Trauma** v. 5, p. 79–96, 2003.

WALTER, E., MOELLING, K., PAVLOVIC, J., MERKLE, H.P. Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, **Journal of Controlled Release**, v. 61, p. 361–374, 1999.

WEBER, R.A., BREIDENBACH, W.C., BROWN, R.E., JABALEY, M.E., MASS, D.P. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.106, p.1036–45, 2000.

WEI, X., XIA, Z.S., WONG, C., BAJI, A. Modelling of mechanical properties of electrospun nanofiber network. **International Journal of Experimental and Computational Biomechanics**, v. 1, p 45-57, 2009.

WILLIAMS, L.R., LONGO, F.M., POWELL, H.C., LUNDBORG, G., VARON, S. Spatial temporal progress of peripheral nerve regeneration within a silicone chamber: parameters for a bioassay. **Journal of Comparative Neurology**, v. 218, p. 460-470, 1983.

WONG, S.C., BAJI, A., LENG, S.W. Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone). **Polymer**, v. 21, p. 4713-4722, 2008.

WOODRUFF, M.A., HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer – polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1195–1310, 2010.

WOODWARD, S.C., BREWER, P.S., MOATAMED, F., SCHINDLER, A., PITT, C.G. The intracellular degradation of poly-epsilon-caprolactone. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 19, p. 437-444, 1985.

VAN LAIR, C. De la regeneration des nerfs peripheriques par le procede de la suture tubulaire. **Archives des Biologie**, Paris, v. 3, p. 379-496, 1882.

VAN NATTA FJ, HILL JW, CARRUTHERS WH. Polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 455-459, 1934.

VATANKHAH, E., PRABHAKARAN, M. P., SEMNANI, D., RAZAVI, S., MORSHED, M., RAMAKRISHNA, S., Electrospun tectophilic/gelatin nanofibers with potential for small diameter blood vessel tissue engineering. **Biopolymers**, v. 101, p. 1165-1180, 2014.

VALERO-CABRE, A., TSIRONIS, K., SKOURAS, E., NAVARRO, X., NEISS, W.F. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. **Journal of Neurotrauma**, v. 21, p. 95–108, 2004.

VELEIRINHO, B., COELHO, D.S., DIAS, P.F., MARASCHIN, M., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. et al., Nanofibrous poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin

regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 343–350, 2012.

VERONESE, F.M., MERO, A. The impact of PEGylation on biological therapies. **Biodrugs**, v. 22, p. 315-329, 2008.

VON BUNGNER, O., Ueber die degenerations und regenerationsvorgänge an nerven nach verletzungen. **Beitr. Path. Anat.**, v. 10, p. 321-393, 1891.

HAIJIAN XIA, H., CHEN, Q., FANG, Y., LIU, D., ZHONG, D., WU, H., XIA, Y., YAN, Y., TANG, W., SUN, X. Directed neurite growth of rat dorsal root ganglion neurons and increased colocalization with Schwann cells on aligned poly(methylmethacrylate) electrospun nanofibers. **Brain Research**, v. 1565, p. 1 8 – 2 7, 2014.

XU, Q.G., MIDHA, R., MARTINEZ, J.A., GUO, G.F., ZOCHODNE, D.W. Facilitated sprouting in a peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 152, p. 877–887, 2008.

XUA, C.Y., INAIC, R., KOTAKIB, M., RAMAKRISHNA, S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 877–886, 2003.

XIA, H., CHEN, Q., FANG, Y., LIU, D., ZHONG, D., WU, H., XIA, Y., YAN, Y., TANG, W. Directed neurite growth of rat dorsal root ganglion neurons and increased colocalization with Schwann cells on aligned poly(methyl methacrylate) electrospun nanofibers. **Brain Research**, v. 1565, p. 18-27, 2014.

XIE, J., MACEWAN, M.R., LI, X., SAKIYAMA-ELBERT, S.E., XIA, Y. Neurite outgrowth on nanofiber scaffolds with different orders, structures, and surface properties. **ACS Nano**, v.3, p. 1151-1159, 2009.

YANG, F., MURUGAN, R., WANG, S., RAMAKRISHNA, S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 2603-2610, 2005.

YAO, L., O'BRIEN, N., WINDEBANK, A., PANDIT, A. Orienting neurite growth in electrospun fibrous neural conduits. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**. v. 90, p. 483-491, 2009.

YOON, Y. I., PARK, K. E., LEE, S. J., PARK, W. H. Fabrication of microfibrinous and nano-/microfibrinous scaffolds: melt and hybrid electrospinning and surface modification of poly(L-lactic acid) with plasticizer. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

YU, H., JIA, Y., YAO, C., LU, Y. PCL/PEG core/sheath fibers with controlled drug release rate fabricated on the basis of a novel combined technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 469, p. 17-22, 2014.

YU, H.; LIU, J.; MA, J.; XIANG, L. Local delivery of controlled released nerve growth factor promotes sciatic nerve regeneration after crush injury. **Neuroscience Letters**, v. 566, p. 177–181, 2014.

YUAN, H., ZHAO, S., TU, H., LI, B., LI, Q., FENG, B., PENG, H., ZHANG, Y. Stable jet electrospinning for easy fabrication of aligned ultrafine fibers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, p. 19634–19638, 2012.

YUAN, X., ZHANG, Y., DONG, C., SHENG, J. Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning. **Polymer International**, v. 53, p. 1704–1710, 2004.

ZELTINGER, J., SHERWOOD, J.K., GRAHAM, D.A., MUELLER, R., GRIFTH, L.G. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 557–572, 2001.

ZHANG, C., YUAN, X., WU, L., HAN, Y., SHENG, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**, v. 41, p. 423–432, 2005.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-10, 1983.

ZONG, X., KIM, K., FANG, D., RAN, S., HSIAO, B.S., CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes, **Polymer**, v. 43, p. 4403-4412, 2002.

ZHONG, S., TEO, W. E., ZHU, X., BEUERMAN, R. W., RAMAKRISHNA, S., YUNG, L. Y. L. An aligned nanofibrous collagen scaffold by electrospinning and its effects on in vitro fibroblast culture.

Journal of Biomedical Materials Research Part A, v. 79, p. 456-463, 2006.

ZHU, W.; MASOOD, F.; O'BRIEN, J.; ZHANG, L.G. Highly aligned nanocomposite scaffolds by electrospinning and electrospraying for neural tissue regeneration. **Nanomedicine**, v. 11, p. 693–704, 2015.

ZHU, Y., SHAH, N.H., MALICK, A.W., INFELD, M.H., MCGINITY, J.W. Solid-state plasticization of an acrylic polymer with chlorpheniramine maleate and triethyl citrate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 241, p. 301–310, 2002.

ZUSSMAN, E., THERON, A., YARIN, A.L. Formation of nanofiber crossbars in electrospinning. **Applied Physics Letters**, v. 82, p. 973-975, 2003.

8. APÊNDICE

PUBLICAÇÃO: “EFFECT OF COLLECTOR DESIGN ON THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF POLYCAPROLACTONE ELECTROSPUN FIBERS”

Materials Letters 193 (2017) 154–157

EFFECT OF COLLECTOR DESIGN ON THE MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF POLYCAPROLACTONE ELECTROSPUN FIBERS

Manuel A. Alfaro De Prá^{a,b}, Rosa M. Ribeiro-do-Valle^a, M. Maraschin^a, Beatriz Veleirinho^{a,b}

^aNanoBioMat, Federal University of Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil

^bNanoScoping, 88040-400 Florianópolis, Brazil

Abstract

Polycaprolactone (PCL) fibers were produced by electrospinning using three collectors: rotating drum, static copper wires, and a rotating mandrel. The effect of collector design on the alignment and morphology of fibers was evaluated. The drum collector produced a typical tridimensional structure whereby the rotational speed mechanically stretches fibers and affects their diameter and alignment. Randomly oriented fibers with an average diameter of 1142 ± 391 nm were obtained at 0 rpm, while aligned fibers with an average diameter of 663 ± 334 nm were produced at 2000 rpm. Static copper wires produced a novel fiber pattern in which the degree of orientation of the fibers is related to the electrical field distribution along the collector. The best fiber alignment and lowest average fiber diameter (490 ± 131 nm) were obtained using parallel copper wires with a gap of 1 cm. Two main forces influenced the fibers produced by the rotating mandrel. First, the attraction of the electrical field by the collector induced the deposition of fibers parallel to its axis with an average diameter of 606 ± 329 nm. Second, the stretching force from the high-speed rotation induced the deposition of fused fibers transverse to the collector axis.

1. Introduction

Electrospinning is a versatile technique used to produce micron and submicron fibers from a wide range of polymers. Using this technique, fiber formation starts when an electrical field is generated on the surface of a polymeric solution and the electrical potential force overcomes the surface tension of the solution, thereby changing the spherical drop to a conical shape, an effect known as the Taylor cone. Electrically charged jets arise from the tip of the cone. Then electrostatic forces create a curled and chaotic movement, or bending instability, driving the jets to the collector. Meanwhile, continuous nanofiber elongation and solidification take place, yielding interconnected fibrous structures with high porosity and expanded surface area [1-2]. Therefore, collector characteristics strongly influence the electrical field and, consequently, the architectural deposition of the electrospun fibers. [3-7].

PCL is a synthetic and resorbable polyester with excellent biocompatibility. Because these characteristics, this polymer has been widely applied to produced new electrospun scaffolds for tissue engineering [8]. This letter aims to demonstrate the effect(s) of collector design on patterns of PCL micro and nanofibers. Different collector configurations based on conductive wires, rotating drum and mandrel were explored. The effect(s) of collector design on the electrical field and its resultant impact on fiber architecture was discussed.

2. Experimental

2.1 Materials

Polycaprolactone (PCL) 80 kDa and solvents were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2 Preparation of Electrospun Fibers

Micro and nanofibers were produced with a typical electrospinning equipment with three distinct metallic collectors: a rotating drum, 6 mm grounded parallel copper wires, and 1 mm rotating mandrel (see Supplementary Material, Fig. S1). Electrospinning solutions were obtained by dissolving PCL 10% (w/v) in a blend of chloroform: dichloromethane: dimethylformamide (6: 3: 1, v/v/v). Electrospinning parameters were set as follows: solution flow rate of 1 mL/h, voltage 15 kV, and needle to collector distance of 10 cm. All protocols were

performed under controlled conditions, i.e., relative humidity = $50\pm 10\%$ and temperature = $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.3 Characterization of Electrospun Fibers

Electrospun mats were analyzed through scanning electron microscopy (SEM, Hitachi S4100) at an accelerating voltage of 10 or 15 kV. Fiber alignment and average diameters were calculated from 100 measurements per image from three experiments using Image J software (Image J 1.37c, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

2.4 Statistical Analyses

All data were compared by one-way ANOVA, followed by post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

Fibers deposited on the surface of the drum collector formed a typical layer-by-layer 3D structure. Figure 1 shows the impact of rotation on PCL fiber characteristics. For a static drum, randomly oriented fibers with an average diameter of 1142 ± 391 nm were obtained. Increasing the rotation speed to 2000 rpm caused a significant decrease in the mean fiber diameter to 663 ± 334 nm. This decrease is related to the stretching force caused by high rotation during fiber deposition on the collector. Also, narrower fiber diameter distributions were obtained, and more than 75% of fibers presented less than 20 degrees of alignment deviation in relation to the zero angle. The chaotic motion of the charged jets and the aerodynamic drag forces from the collector at high speed, however, hamper the formation of a perfectly aligned structure [7].

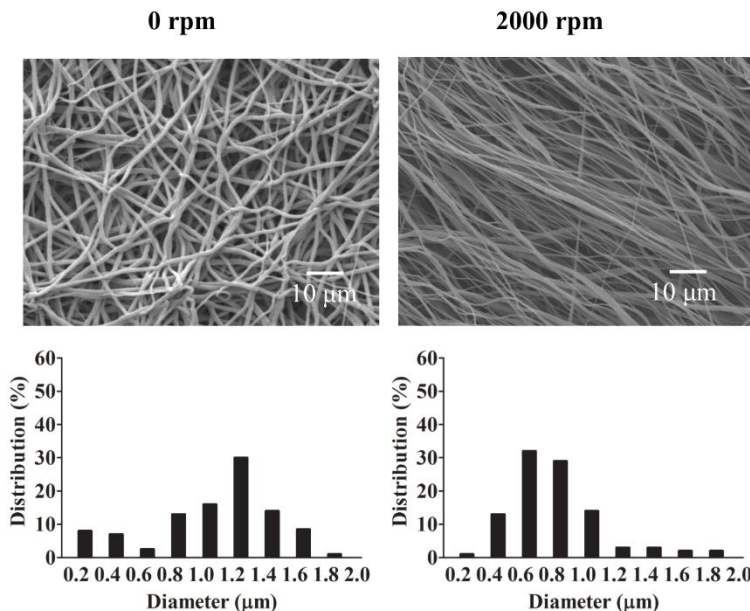


Fig. 1. SEM images and their respective fiber diameter distribution, showing the effect of rotational speed on the characteristics of fibers collected on the rotating drum.

A similar fiber alignment pattern was obtained using parallel copper wires with a gap of 1 cm. The parallel wires directed the electrified jets toward a specific direction and yielded aligned nanofibers with an average diameter of 490 ± 131 nm. This represented a significant decrease relative to fibers obtained from the drum collector, as well as narrower fiber diameter distribution (Fig. 2). Similar to the rotating drum (set at 2000 rpm), more than 75% of fibers presented less than 20 degrees of alignment deviation in relation to the zero angle (see Supplementary Material, Fig. S2). Aligned fiber patterns could direct neurite outgrowth of nerve cells along the fiber and can be applied to produce scaffolds for nerve regeneration [9].

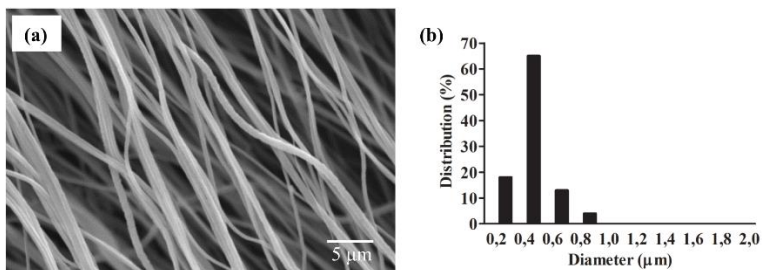


Fig. 2. SEM image (a) and its respective fiber diameter distribution (b), showing the first layers of fibers deposited on the parallel copper wires collector (gap = 1 cm).

After deposition in 1 mL of solution, a novel pattern of fiber organization characterized by the presence of bundles of aligned fibers throughout the matrix was acquired (Fig. 3a and 3b). Between the aligned bundles, two different unaligned fiber designs were detected. One exhibited typical randomly oriented straight fibers with an average diameter of 730 ± 384 nm (Fig. 3d) close to the aligned bundles. Another design exhibited curved fibers with an average diameter of 1132 ± 364 nm (Fig. 3c) on the central area between the bundles. Electrospun fiber bundles can be explored to improve mechanical resistance in composites and scaffolds applied in tissue engineering [10]. As previously reported [7], the first layer of polymeric fibers deposited on the collector exerts an insulating effect that affects electrical field distribution and fiber architecture. This effect was observed in the present study and resulted in a mat composed of a triple fiber pattern, featuring 1) bundles of aligned nanofibers (high electric field strength), 2) straight-unaligned nanofibers (intermediate electric field strength), and 3) curved unaligned fibers (low electric field strength). In contrast, increasing the gap to 5 cm afforded only randomized fibers (see Supplementary Material, Fig. S3).

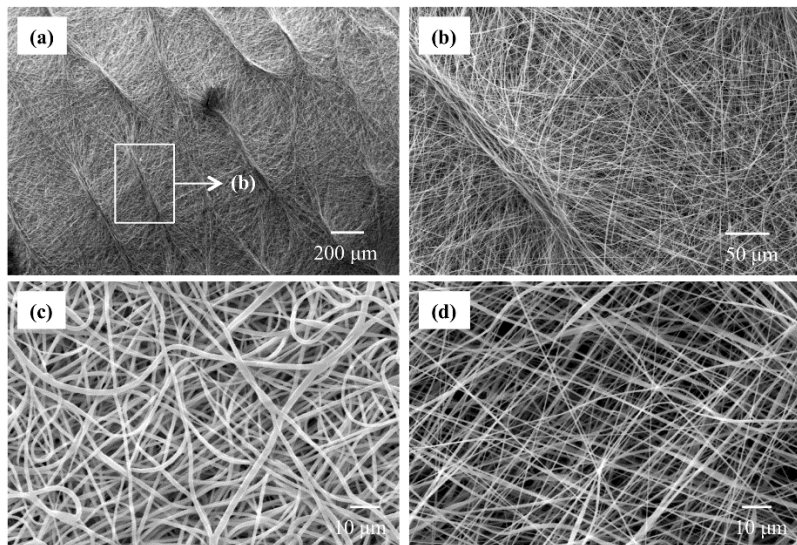


Fig. 3. SEM images of the fiber patterns acquired using the copper wire collector (gap = 1 cm) after applying 2 mL of polymer solution. Structures formed by a high density of aligned fibers throughout the mat (a); highlight from image a (b); and fiber patterns observed along the electrospun mat (c,d).

Tubular scaffolds produced by mandrel collectors are fundamental for engineering of nerves and blood vessels [9, 11]. Figure 4a shows a 3D cylindrical structure produced by the rotating mandrel collector at 2000 rpm. A regular fiber alignment was not observed on the mandrel surface at the same rotational speed, i.e., 2000 rpm. The mandrel collector originated a repetitive micropattern of fused-aligned fiber bundles, crosswise to the mandrel axis, separated by gaps of 150-200 μm , and filled with nanofibers with an average diameter of 606 ± 329 nm distributed parallel to the axis (Fig. 4b and 4c). Again, the pattern was formed in response to *i*) the electrical field distribution along the polymer charged jets and *ii*) the stretching force of the rotational collector.

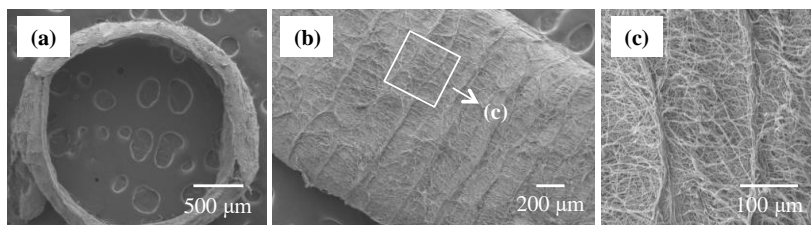


Fig. 4. SEM images of the fiber patterns produced by the rotating mandrel collector. Cross section view (a); longitudinal view (b); and highlight from image b, evidencing the pattern of radially fused fibers separated by gaps of 150-200 μm , filled with transversal fibers (c).

4. Conclusions

Different fiber patterns were achieved by exploring various collector designs. For the rotating drum, the force of rotational speed stretches the fibers, resulting in alignment and reduction in diameter. For the static collector, electrostatic forces stretch fibers transversely between the consecutive wires, forming a high density of aligned fibers perpendicular to the wires. For the rotating mandrel, the electrostatic forces attract fibers parallel to its axis, while fused fibers are formed transversely to its axis by the high rotational speed. Exploring the design of the electrospinning collector can determine the morphology of electrospun fibers, as well as the way fibers are assembled into structures with unique characteristics for specific applications.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq/FAPESC (Brazil) through the PRONEX project 17420/2011/3. M. de Prá acknowledges CAPES for his Ph.D. fellowship and M. Maraschin CNPq for his research fellowship. Authors acknowledge the Central Laboratory of Electron Microscopy (UFSC) for microscopic analysis.

References

- [1] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325–347.
- [2] D.H. Reneker, A.L. Yarin, Electrospinning jets and polymer nanofibers, *Polym. J.* 49 (2008) 2387–2425.
- [3] P. Katta, M. Alessandro, R.D. Ramsier, G.G. Chase, Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector, *Nano Lett.* 4 (2004) 2215–2218.
- [4] G.H. Kim, Electrospinning process using field-controllable electrodes, *J. Polym. Sci. Part B* 44 (2006) 1426–1433.
- [5] G. Kim, W. Kim, Nanofiber spraying method using a supplementary electrode, *Appl. Phys. Lett.* 89 (2006) 013111.
- [6] E. Zussman, A. Theron, A.L. Yarin, Formation of nanofiber crossbars in electrospinning, *Appl. Phys. Lett.* 82 (2003) 973–975.
- [7] R. Sahay, V. Thavasi, S. Ramakrishna, Design modifications in electrospinning setup for advanced applications, *J. Nanomater.* (2011) 1–17.
- [8] D. Mondal, M. Griffith, S. Subbu, S.S. Venkatraman, Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: current scenario and challenges, *Int. J. Polym. Mater.* 65 (2016) 255–265.
- [9] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 2603–2610.

[10] M. Abbasipour, R. Khajavi, Nanofiber bundles and yarns production by electrospinning: a review, *Adv. Polym. Technol.* 32 (2013) 1–9.

[11] E. Vatankhah, M.P. Prabhakaran, D. Semnani, S. Razavi, M. Morshed, S. Ramakrishna, Electrospun tecophilic/gelatin nanofibers with potential for small diameter blood vessel tissue engineering, *Biopolymers* 101 (2014) 1165–1180.

Electronic Supplementary Material

Effect of collector design on the morphological properties of polycaprolactone electrospun nanofibers

Manuel A. Alfaro De Prá^a, Beatriz Veleirinho^a, Marcelo Maraschin^a

NanoBioMat, Department of Biotechnology and Biosciences, Biological Sciences Center, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, Brazil.

S1. Influence of collector design on PCL electrospun fibrous mats

The influence of the collector design on the PCL nanofibers pattern was evaluated through three distinct configurations as illustrated in **figure S1**: a rotating drum (a), 6 mm grounded copper wires in parallel position and distant 1 cm from each other (b), and rotating mandrel of 1 millimeter diameter (c).

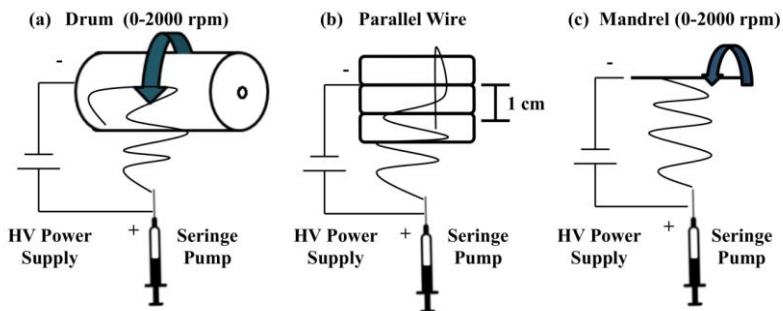


Fig. S1. Schematic electrospinning setup and differences in the collector design. (a) Rotating drum with rotating speed ranging from 0 to 2000 rpm. (b) Static conductive wires collector with 1 cm distance between each other and (d) Mandrel collector with rotating speed settled at 2000 rpm.

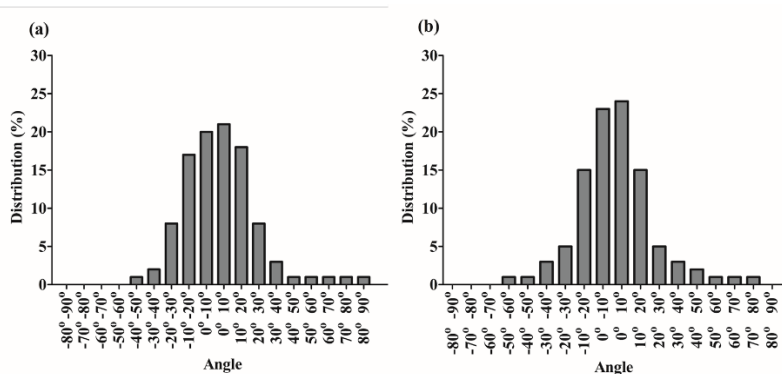


Fig. S2 Alignment analyses showing orientation deviation from (a) fibers produced by the rotating drum settled at 2000 rpm and (b) from fibers produced by the parallel wires.

S3. Morphological characteristics of the electrospun fibrous mats produced in parallel copper wire

Figure S3 shows nanofibers pattern produced by parallel copper wires with a gap of 5 cm. The first layers of fibers (electrospun from 1 mL of polymer solution) were characterized by yielded randomized nanofibers (**figure S3 a**). As noted previously, the thickness of the matrix influences the electrical field distribution and the pattern of the subsequent layer of fibers. The insulating effect of the first polymer nanofiber layers results in two nanofibers pattern distribution characterized by the presence of randomized fibers (**figure S3 b**) and curled fibers (**figure S3 c**) throughout the same mat.

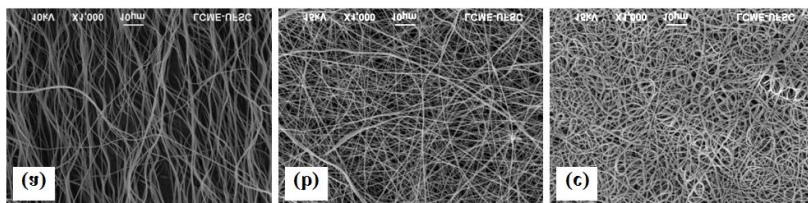


Fig. S3 SEM images showing nanofibers pattern produced by parallel copper wires with a gap of 5 cm. (a) the first layer of fibers after the deposition of 1 mL; (b) and (c) fiber patterns observed in the same mat after applying 2 mL of polymer solution.

Publicação: *“The Effect of polyethylene glycol on polycaprolactone electrospun scaffolds: morphology, mechanical properties and nerve growth factor delivery profile”.*

Submetida ao Materials Science and Engineering C

THE EFFECT OF POLYETHYLENE GLYCOL ON POLYCAPROLACTONE ELECTROSPUN SCAFFOLDS: MORPHOLOGY, MECHANICAL PROPERTIES AND NERVE GROWTH FACTOR DELIVERY PROFILE

Manuel A. Alfaro De Prá^a, Rosa M. Ribeiro-do-Valle^a, J. A. Lopes-da-Silva^b, M. Maraschin^a, and Beatriz Veleirinho^{a*}

^aNanoBioMat, Federal University of Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, Brazil

^bQOPNA Research Unit, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal

Abstract

Electrospinning is a promising technique to generate scaffolds for delivery systems and nerve tissue engineering. This study aimed to investigate the suitability of polyethylene glycol (PEG) as an agent to prolong circulation time in the delivery of nerve growth factor (NGF) encapsulated into polycaprolactone (PCL) electrospun fibers. Three types of PEG molecular weights (400, 1500, and 35000 Da) and concentrations (1, 5, and 10% ratio to PCL) were studied. The effect on NGF from the scaffolds was evaluated by neuronal differentiation using PC12 cells. Scaffolds were characterized for their architecture by Scanning Electron Microscopy (SEM) and for their mechanical properties. Cytotoxicity was evaluated by MTT and agarose overlay methods. The effect of fiber architecture on PC12 morphology was also investigated. Nanofibrous hybrid mats were obtained for all PCL/PEG blends tested. Addition of PEG caused a reduction in the average diameter due to the increased stretching ability during the electrospinning process. This reduction on fiber diameter had impact on mechanical properties of the fibrous scaffolds and lower tensile strength and elongation were observed for scaffolds with 5% and 10% of PEG. The co-lyophilization of NGF with PEG prior to nanofiber production improved the delivery profile of NGF, stimulating cell differentiation even after 28 days of continuous release.

1. Introduction

Over the last decade there has been a growing interest in electrospun nanofiber scaffolds for tissue engineering and delivery systems. Polymeric nanofibers present attractive characteristics, such as tridimensional structure and high surface area, which, when associated with the versatility of the electrospinning process, allow the production of scaffolds with distinct architectures from a wide range of natural and synthetic polymers [1, 2]. In general, the basic scaffold requirement is biocompatibility. However, biodegradability, architecture, and mechanical resistance must also be suited to an intended application. All these criteria depend on the manufacturing process and on the polymer system used in scaffold production [3].

Biodegradable aliphatic polyesters comprise a group formed by polymers and copolymers of lactic acid, glycolic acid, and ϵ -hydroxycaproic acid conventionally used as drug carriers in implantable and injectable delivery systems. Owing to their good biocompatibility and mechanical properties, these polymers have become highly attractive for the production of scaffolds to be used in tissue regeneration [4]. Such scaffolds are constantly subjected to mechanical stress, e.g., peripheral nerves. For this reason, the mechanical properties of the scaffold depend on several characteristics (e.g. chemical composition, thickness, and porosity) and should be similar to the natural nerve, in order to support physiological and mechanical requirements during the regeneration process [5].

Polycaprolactone (PCL) is a hydrophobic, resorbable polyester with long-term degradation. Based on its good biocompatibility, low cost and superior rheological and viscoelastic properties over other aliphatic polyesters, PCL has gained considerable attention in the biomedical field. Moreover, PCL is approved by the U.S. FDA for use in medical devices and has excellent blending compatibility with other polymers. This feature has been explored with the aim of improving its hydrophilicity and biocompatibility, as well as optimizing degradation kinetics and release profile of bioactive substances [6].

The delivery of bioactive compounds, such as cytokines, adhesion molecules, and growth factors, directly on the site of an injury can dramatically improve the regenerative process, as these biomolecules will govern cell behavior [7, 8], as it happens for the nerve growth factor (NGF), a neurotrophic factor that plays an important role in nerve regeneration [9]. To avoid its rapid degradation in the biological environment and preserve its bioactivity, NGF must be stabilized and

released directly at the site of injury in a prolonged manner. PCL nanofibers loaded with NGF have already been developed and evaluated as nerve regeneration devices [10]. However, as a result of its hydrophobicity, PCL must be dissolved in organic solvents prior to the electrospinning process. Direct incorporation of NGF into organic PCL solution leads to peptide degradation, as well as reduced loading efficiency and burst release. To overcome these drawbacks, the application of hydrophilic polymers has been studied to protect and control the delivery of peptides from polyester films and nanofibers [11]. In this sense, polyethylene glycol (PEG), a hydrophilic polymer widely used in pharmaceutical products, has been blended with PCL with the goal of controlling the delivery of drugs and bioactive proteins from scaffold nanofibers [12, 13]. Importantly, PEG has also a protective function over growth factors. In this regard, Pean et al. have shown that the co-lyophilization of NGF and PEG preceding exposure to organic solvents preserves the bioactivity of the peptide during poly(L-lactic acid) (PLA) microspheres manufacturing processes [14]. This effect has been attributed to the ability of PEG to create a hydrophilic environment which reduces contact with organic phases and stabilizes NGF [15, 16]. PEG is also a known fusogenic agent used to produce hybridomas for antibody production [17, 18]. This property has also been successfully explored to fuse damaged axons and restore nerve function in nerve injuries. The proposed mechanism relies on the ability of PEG to remove the moisture barrier and reduce the activation energy for axonal fusion [19]. Therefore, integrating PEG into bioengineering devices represents a promising approach for nerve tissue regeneration.

The aim of this work was to develop PCL/PEG composite nanofibrous scaffolds for NGF delivery. For that, NGF and bovine serum albumin (BSA) were co-lyophilized with PEG prior adding them together to the PCL solution to produce electrospun scaffold. The effect of PEG molecular weight and concentration on the architecture, mechanical properties, cytotoxicity, weight loss, NGF release kinetics and bioactivity, was evaluated. Finally, NGF bioactivity was assessed by evaluating the differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cell line, which differentiates into a neuronal phenotype in the presence of NGF. PCL/PEG composites were compared to PCL mat to illustrate the potential of PEG in control the degradability and the NGF release from electrospun scaffolds.

2. Materials and methods

2.1 Materials

PCL (M_w 80 000 Da), PEG (M_w 400, 1500, and 35000 Da), chloroform and ethanol were purchased from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). NGF, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT), agarose, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI-1640), fetal bovine serum, horse serum, HEPES, L-glutamine, and penicillin/streptomycin were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). All reagents were of analytical grade.

2.2 Nanofiber production

Nanofibers were produced using an electrospinning setup consisting of a high voltage power supply (Spellman CZE 1000R), a syringe with a metallic needle, a syringe pump (Harvard apparatus PHD 2000), and a metallic rotating drum as collector. Electrospinning solutions were obtained by dissolving PCL (12% w/v) in chloroform: ethanol (7:3 v/v) solution prior to the addition of PEG (M_w 400, 1500, or 35000 Da). Three PCL/PEG ratios were evaluated: 100:1, 100:5, or 100:10 (w/w).

To encapsulate NGF, 120 μ L of a NGF/BSA (1:50 w/w) solution containing 120 μ g NGF was blended with PEG aqueous solutions containing 120 mg PEG. NGF/BSA (control) or PEG/NGF/BSA solutions were lyophilized prior to adding to PCL (12% w/v) solution. After blending the systems were maintained under stirring for 30 minutes.

After optimization, electrospinning operational parameters were set as follows: solution flow rate of 1 mL/h, voltage of 15 kV, needle to collector distance of 10 cm, and 200 rpm collector rotating speed. All protocols were performed under controlled conditions, i.e., relative humidity of $50 \pm 10\%$ and temperature $20 \pm 2^\circ$ C. To remove any residual solvent, mats were dried at $37 \pm 2^\circ$ C for 24 h under vacuum. All experiments were performed in triplicate of three independent experiments.

2.3 Nanofiber characterization

Nanofiber morphology was characterized using SEM (Hitachi S4100) at an accelerating voltage of 10 kV. Average diameter and fiber distribution were calculated from 100 measurements per image in

triplicate from three experiments using ImageJ software (ImageJ 1.37c, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Mechanical properties were evaluated by uniaxial tensile tests using a texture analyzer equipment (Model TA.Hdi, Stable Micro Systems, England) equipped with fixed grips. Test specimens 70-mm long and 10-mm wide were mounted on the grips using stick tape. The thickness of the test samples was measured at different locations on each sample using a digital micrometer (Model MDC-25S, Mitutoya Corp., Tokyo, Japan). The initial grip separation was set at 50 mm, and the crosshead speed was 0.5 mm/s. Young's modulus (E), percentage elongation or ultimate break strain (ϵ_b), yield strength or stress at maximum force (σ_y), and tensile strength or stress at break or ultimate tensile strength (σ_b) were determined from stress–strain curves obtained from uniaxial tensile tests to sample failure. All experiments were conducted at 20 °C (± 2 °C)/50 % (± 2 %) RH. At least eight samples of each mat were tested.

2.4 Cell culture studies

L929 mouse fibroblast cells were cultured in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin. PC 12 cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 5 % fetal bovine serum, 10 % horse serum, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 g/mL streptomycin. Differentiation was induced by adding 50 ng/mL of NGF. The medium was replaced every 48 h, and all cultures were maintained at 37 °C in a wet atmosphere containing 5 % CO₂. When the cells reached 70 % confluence, they were treated with 0.25 % trypsin containing 1 mM EDTA and then counted by a hemocytometer prior to use. Prior to biological assays, all scaffolds were sterilized under UV light for 1 h (both faces).

2.5 *In vitro* indirect cytotoxicity

Indirect cytotoxicity evaluation was adapted from ISO 10995-5. Briefly, scaffold pieces (4 mm diameter, 0.5 \pm 0.1 mm thickness) were placed in a 96-well tissue culture plate (TCP, Techno Plastic Products) and incubated at 37 °C in fresh culture medium for 24 h to prepare the extraction media (100 μ L/well). L929 mouse fibroblasts were seeded in a 96-well culture plate at density of 5 x 10³ cells/well using fresh DMEM medium and then incubated at 37 °C and 5 % CO₂. After 24 h, the culture medium was removed, replaced with the extraction medium of each

specimen and the cells were further incubated. Fresh medium was used as control. After 48 h the extraction medium was removed and the viability of cells was determined by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)2, 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, as previously described [20]. The absorbances were quantified at 570 nm using an ELISA microplate reader (SpectraMax Paradigm; Molecular Devices, CA, USA). Data were expressed as a percentage of mean absorbances \pm standard error of the mean of three independent experiments. For each experiment $n=6$.

2.6 Agarose overlay assay

L929 mouse fibroblasts were seeded in 6-well culture plates at a density of 2×10^6 cell/well and incubated until fully confluent. Then, culture medium was replaced by an agarose solution in DMEM (1.6% w/v). PCL or PCL/PEG nanofiber discs (6 mm diameter) were placed on agarose. As positive control, a 6 mm cellulose disc previously embedded with 25 μ L of sodium dodecyl sulfate (SDS) aqueous solution (10 % w/v) was used. Negative control was a 6 mm cellulose disc. After 24 h, discs were withdrawn, and 2 mL of MTT solution (0.5 mg/mL) were added to each well. The culture was maintained at 37 °C in CO₂ atmosphere until a dark color appeared. Cultures were observed macroscopically for cell discoloration to determine cell lysis and microscopically to determine any morphological change. Results were determined based on the zones of lyses of each material and compared with the toxicity ranking of detergent (SDS) based on the *in vivo* Draize irritancy test as previously described [21]. All experiments were performed in triplicate of three independent experiments.

2.7 Bioactivity of NGF released from nanofibers

NGF bioactivity was assessed by evaluating the differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cell line, which differentiates into a neuronal phenotype in the presence of NGF [22]. For this, NGF-enriched scaffolds were transferred to culture flasks containing RPMI culture medium (1 mL of medium for every 10 mg of scaffold). The supernatant of the culture medium was replaced after 6 h, 1, 2, 7, 14, 21, and 28 days and kept refrigerated at -80 °C until use (NGF extracting medium). PC12 cells were cultured in 24-well plates at a density of 3×10^4 cells/well with 1 mL of the RPMI supernatant medium (NGF extractant medium). Cells were cultured for 7 days, and the extracting medium was replaced every 2 days. Images of PC12 cells were taken through an optical microscope,

and the number of differentiated cells was counted. Cells containing at least 1 neurite greater than the cell diameter were considered differentiated. Cells cultured with RPMI containing 50 ng of NGF were used as positive control and fresh RPMI as negative control. Cell counts were made from images of five fields per well in triplicate, from three independent experiments.

2.8 Statistical analyses

The data were expressed as mean \pm standard error of the mean and compared by Student's *t*-test or one-way ANOVA, followed by post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1 Effect of PEG on PCL nanofibers

In the present work, the blending of PCL and PEG was explored to produce composite electrospun scaffolds for NGF delivery. SEM images and fiber diameter distributions of PCL and PCL/PEG composite scaffolds are displayed in Figure 1. PCL presented good compatibility with PEG, as no separation of phases was observed for the polymer blends. Random homogeneous nano- and micro fibers were obtained in most of the electrospun scaffolds produced, which agrees with previous studies in which PCL/PEG blocked co-polymers or simple blends were produced to achieve electrospun fibers [6, 23, 24].

PEG is a known plasticizer approved for pharmaceutical and medical applications. The main role of plasticizers is to improve the processability of other polymers by enhancing flexibility, reducing crystallinity and the glass transition temperature. Plasticizers are classified as internal or external; internal plasticizers reacted with the original polymer yielding co-polymers with lower glass transition temperature and reduced elastic modulus, while external plasticizer interacts with the polymeric chain by internal molecular forces such as dispersion forces, induction forces, hydrogen bonds and dipole-dipole interaction. The presence of a plasticizer may reduce elastic modulus and tensile strength by increasing the polymer chain mobility and the intermolecular separation of polymeric molecules, and by replacing polymer-polymer interaction [25-27].

This study evaluated the effect of PEG on the morphology and mechanical properties of PCL nanofibers. In general, when PEG was

added to PCL solution, narrower fiber distributions (Fig. 1) and lower fiber diameters were obtained (Fig. 2). This effect is associated with an increase in the stretching ability of fibers containing the plasticizing agent during the electrospinning process. Yoon *et al.* reported a decrease in poly(L-lactic acid) (PLA) fiber diameter caused by the plasticizing effect of PEG [29], which agrees with our results. During the process of fiber formation, PEG worked as an external plasticizer increasing the flexibility of the molecular chain of the polymers, resulting in a greater bending capability and capacity of fiber elongation. Therefore, maintaining the stretching force from the electrical field and the rotation speed, PCL fibers with higher PEG concentration presented a further elongation, producing fiber with even smaller diameter. This effect also had a direct impact on the mechanical properties of the fibers, as discussed below.

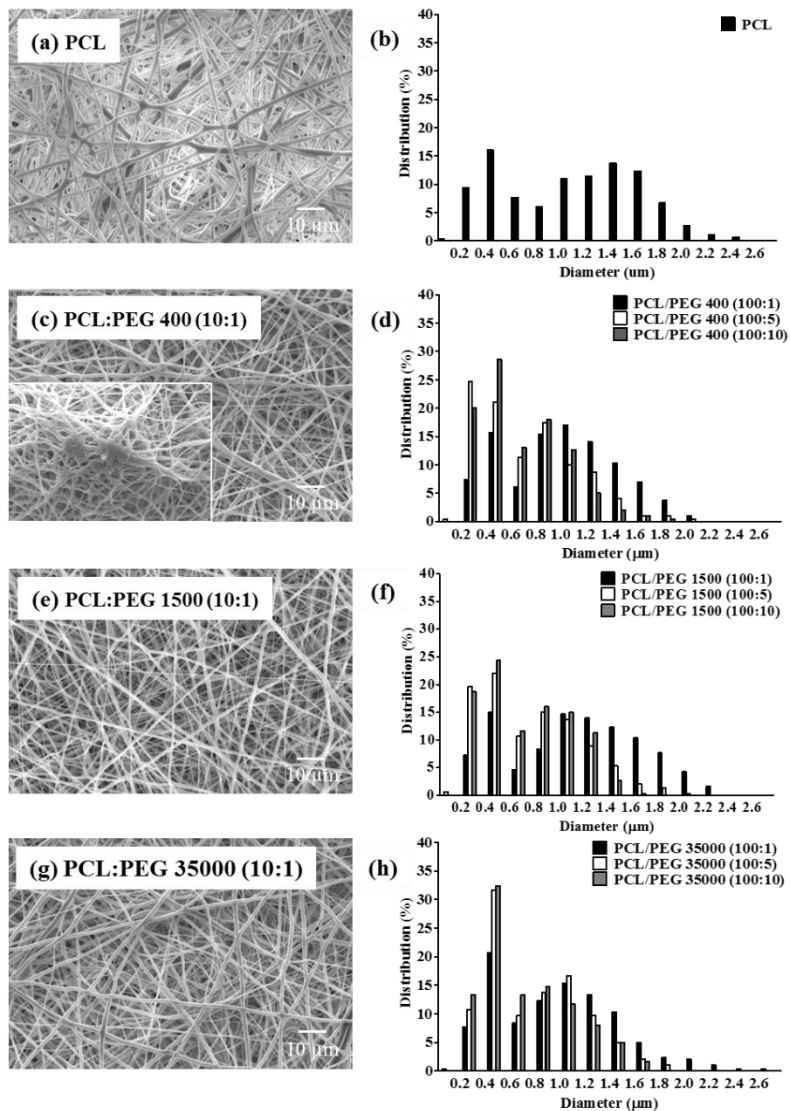


Figure 1. SEM images and the respective fiber distributions of PCL (a, b), PCL/PEG 400 (c, d), PCL/PEG 1500 (e, f), and PCL/PEG 35000 (g, h).

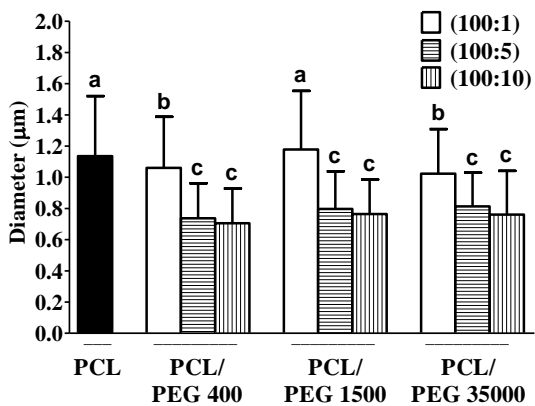


Figure 2. Average fiber diameter of PCL and PCL/PEG nanofiber scaffolds. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

The mechanical properties of nanofiber mats depend on size and distribution, geometrical arrangement, porosity, diameter, and molecular interactions within and between the fibers [30-32]. In this paper, uniaxial tensile tests were performed to evaluate PEG effect on mechanical properties of PCL/PEG composites nanofibers. Average Young's Modulus, tensile strength and percentage of elongation are represented in figure 3. The addition of PEG 400 and 1500 (10%) caused an increase in the Young's modulus which indicates a higher stiffness of these scaffolds ($p < 0.05$). Additionally, incorporation of PEG (5% and 10%) into PCL nanofibers reduced significantly the tensile strength and the elongation at break ($p < 0.05$). These results can likely be attributed to a reduction in the intermolecular forces of PCL polymeric chains caused by the presence of PEG, as also observed for other polymeric system [33]. In addition, the decrease of fiber diameter induced by PEG, may also had contributed to the reduction of mechanical properties observed, as more fragile fibers were present in the hybrid scaffolds.

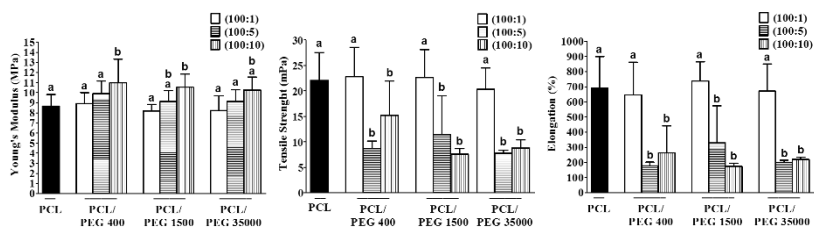


Figure 3. Variation in Young's modulus, tensile strength and elongation at break as a function of PCL/PEG molecular weight and concentration. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

3.2 Cytotoxicity

The basic requirement for materials used as scaffolds for tissue engineering is biocompatibility. PCL is a biodegradable and biocompatible polyester and thus considered safe for use in parenteral devices. In its turn, PEG is a biocompatible polymer applied in pharmaceuticals to prolong the clearance of injectable medicines, among other uses [34]. Here, we have evaluated the cytotoxicity of PCL and PCL/PEG (400 Da, 1500 Da, and 35000 Da) for the higher proportion of PEG in the mixture (100:10 w/w), using L929 mouse fibroblasts. Mitochondrial activity of viable cells was assessed by MTT [35]. In this assay, the optical density was determined to be proportional to the percentage of viable cells cultured with DMEM medium previously exposed to scaffolds, i.e., extracting medium, and compared to control, i.e., fresh medium. Figure 4 shows the viability (%) of L929 cells cultured with PCL and PCL/PEG extracting media. No statistical difference was detected for cells cultured with the scaffold extracting media.

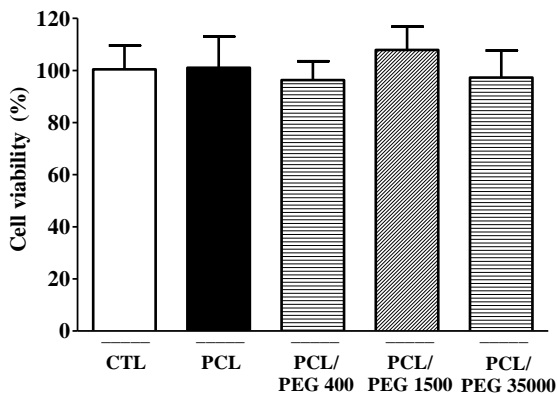


Figure 4. Indirect cytotoxicity of PCL and PCL/PEG (100:10 w/w) scaffolds for fibroblast L929 cell line, as evaluated by MTT. Cell viability (%) was calculated from absorbance at 540 nm after exposure of cells to extractant media. Data were expressed as mean \pm standard deviation of three independent experiments (n=18).

Cytotoxicity was also evaluated by the agarose overlay method, and results are displayed in Figure 5. No zones of lyses or changes in cellular morphology were observed for cells treated with the scaffolds (Fig. 5c and 5d) relative to negative control (Fig. 5b). Thus, both methods indicate that neither of the evaluated scaffolds was cytotoxic to L929 cells.

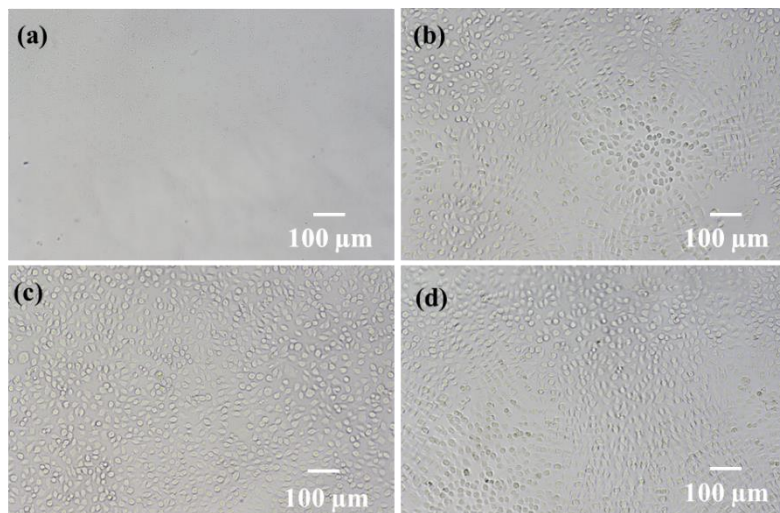


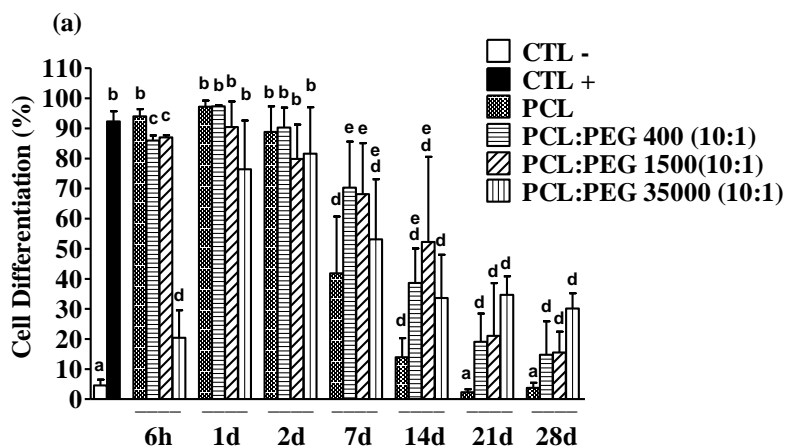
Figure 5. Indirect cytotoxicity of PCL and PCL/PEG (100:10 w/w) scaffolds to fibroblast L929 cell line, as evaluated by agarose overlay method. Representative microscopic images after 24h exposure to positive control (a), negative control (b), PCL scaffolds (c) and PCL/PEG scaffolds (d).

3.3 NGF bioactivity and release profile

The activity of biological molecules, such as growth factors, can be affected not only by the medium conditions (e.g., pH, temperature, organic solvents), but also by the electrospinning conditions themselves, such as electrical field voltage and rate of solvent evaporation, among others [36, 37]. To assess the bioactivity of NGF released from PCL and PCL/PEG scaffolds, the percentage of differentiated PC12 cells was calculated after culturing them with extracting media after previous exposure to the scaffolds for different time (Fig. 6). NGF bioactivity was preserved in all scaffolds evaluated. However, in the presence of PEG 400 Da and 1500 Da, the number of differentiated cells was higher at the 7th, 14th, 21st, and 28th days of release, while in presence of PEG 35000 Da,

cell differentiation occurred mostly after the 7th day (Fig. 6a). Plasticizer with lower molecular weight may leach out more easily from bulk materials [28]. Therefore, the molecular weight of plasticizer may influence the release kinetics of bioactive compounds. In accordance, our results suggest a faster release of NGF for PCL blended with PEGs of low molecular weight (400 and 1500 Da), and a more controlled release for PCL blended with PEG of higher molecular weight (35 kDa). Therefore, PEG has shown significant influence on release kinetic of NGF and can be useful for control the NGF release from the scaffolds.

Although a small amount of NGF has satisfactory efficacy, its excess may cause undesirable effects [38]. NGF stimulus has greater importance in the first 15 days after the injury, considering that in this period the neurites reach the nerve guide and in about 30 days grow 1 cm, for lesions of sciatic nerves of rats [39, 40]. Thus, is necessary an adequate control of the release kinetics of NGF throughout the regenerative process [41]. According with our results, a decrease in initial burst occurs along with prolonged release of NGF with increasing molecular weight of PEG (Fig. 6a and 6b). Consistent with these results, the enhancing effect of PEG on the stability of biological molecules and its release kinetics were previously demonstrated. The rate of release could be controlled by the polymeric chain length of PEG, where the higher molecular weights decrease the initial burst and prolong the release of bioactive substance [10, 38, 42].



(b)

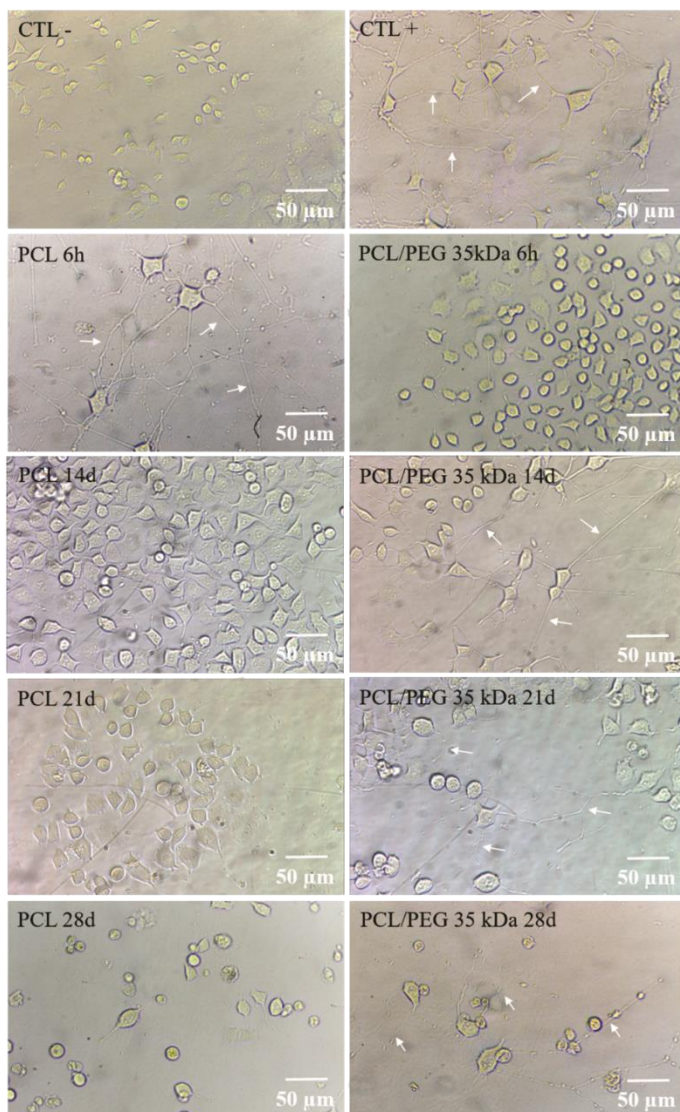


Figure 6. Percentage of PC12 cells differentiated after exposure to NGF extracted from the scaffolds at different time (a). Optical microscopy images of cells exposed to RPMI/NGF extracting media from PCL and PCL/PEG 35 kDa scaffolds for different intervals (6h, 14d, 21d and 28d) (b); arrows indicate neurites. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

SEM images and fiber diameter distributions of PCL and PCL/PEG composite scaffolds after 28 days of RPMI exposure are displayed in Figure 7 (a-h). Thinner fibers were observed for PCL scaffolds blended with PEG after the 28th day (Table 1). Meanwhile, weight loss was lower for PEG at higher molecular weights (Fig. 8). The results showed that the addition of PEG increases scaffold biodegradability, especially for lower molecular weight samples, suggesting that longer PEG molecules have greater interaction with PCL and are more strongly retained. These characteristics also affected the NGF release profile, as previously observed.

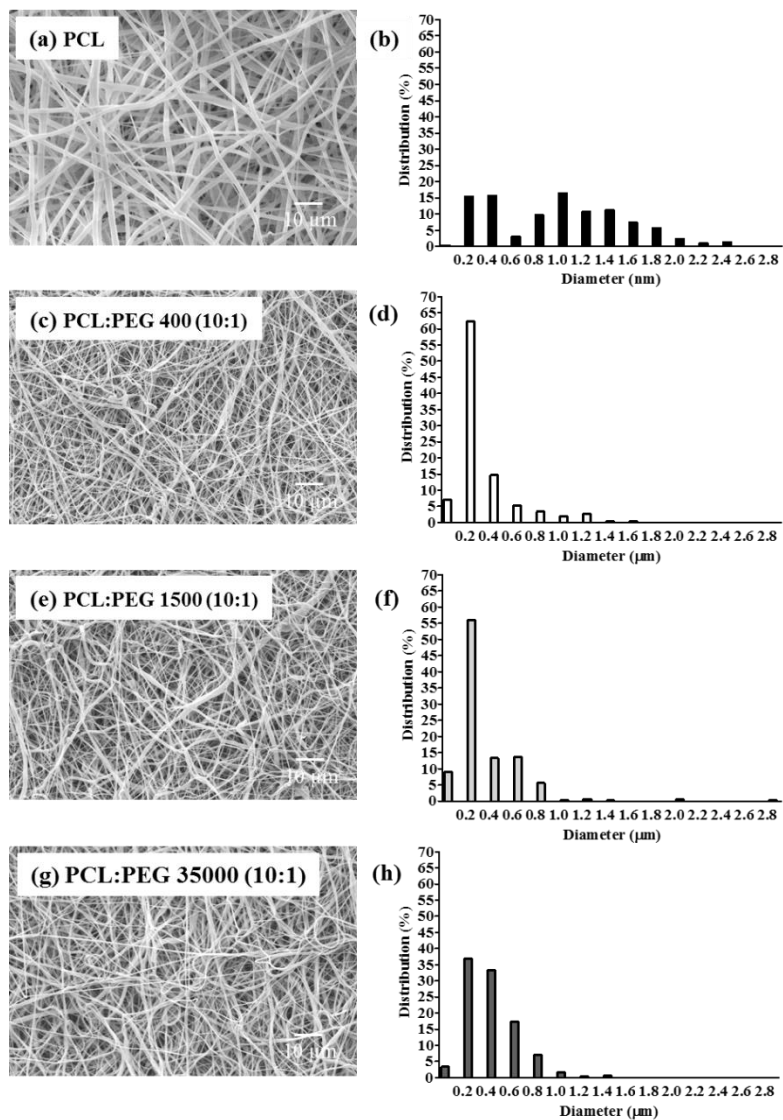


Figure 7. SEM images and the respective fiber distributions of PCL (a, b), PCL/PEG 400 (c, d), PCL/PEG 1500 (e, f), and PCL/PEG 35000 (g, h) after 28 days of exposure to the culture medium.

Table 1. Average fiber diameter (\emptyset) for PCL and PCL/PEG scaffolds before (t_0) and after 28 days (t_{28d}) of exposure to the culture medium.*

Sample	$\emptyset t_0$ (μm)	$\emptyset t_{28d}$ (μm)
PCL	1.136 ± 0.384	1.059 ± 0.564^a
PCL/PEG 400 (10:1)	0.705 ± 0.222	0.441 ± 0.263^b
PCL/PEG 1500 (10:1)	0.764 ± 0.221	0.434 ± 0.303^b
PCL/PEG 35000 (10:1)	0.760 ± 0.280	0.497 ± 0.222^b

* Results shown are average values of triplicate tests (mean standard deviation). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

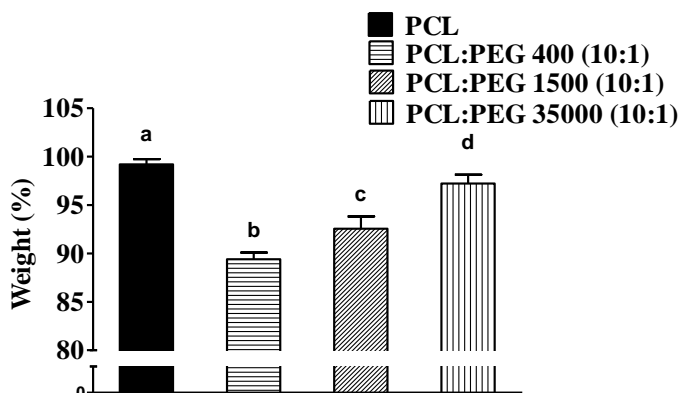


Figure 8. Weight of the scaffolds after 28 days of exposure to the culture medium. Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

4. Conclusion

In conclusion, we have demonstrated the effect of PEG blended with PCL to produce electrospun nanofiber scaffolds, considering three different concentrations and molecular weights. PEG acted as a plasticizer to decrease the average diameter of fibers in a PEG concentration-dependent way. PEG also decreased mechanical resistance and elongation of the scaffolds. The nanofibrous scaffolds were evaluated *in vitro* using fibroblasts and PC12 cells as models. None of the scaffolds was cytotoxic to fibroblasts. Also, the co-lyophilization of NGF with PEG prior to nanofiber production promoted cell differentiation for an extended period and prolonged the effect of NGF. Taken together, results suggest the use of PEG, under controlled conditions of concentration and molecular weight, to design innovative delivery systems of NGF based on nanofibers and the potential of the composite fibrous scaffolds for nerve tissue engineering.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq/FAPESC (Brazil) through the PRONEX project (Grant n° 17420/2011/3). Authors acknowledge the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME-UFSC) for microscopic analysis. The research fellowship from CNPq on behalf of M. Maraschin is acknowledged.

References

- [1] N. Bhardwaj and S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances* 28 (2010) 325–347.
- [2] F. Mohammadian, A. Abhari, K. Nejati-Koshki, A. Akbarzadeh, New state of nanofibers in regenerative medicine, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 45 (2017) 204-210.
- [3] F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, *Materials Today*, 14 (2011) 88-95.
- [4] J. Zhan, A. Singh, Z. Zhang, L. Huang, J. H. Elisseeff, Multifunctional aliphatic polyester nanofibers for tissue engineering, *Biomatter* 2:4 (2012) 202 – 2012.

- [5] V. Chiono & C. Tonda-Turo, Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering, *Progress in Neurobiology* 131 (2015) 87–104.
- [6] M. A. Woodruff & D. W. Hutmacher, The return of a forgotten polymer: Polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science* 35 (2010) 1217–1256.
- [7] M. Vert, Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 20 (2009) 437–46.
- [8] D.E. Discher, D.J. Mooney, P.W. Zandstra, Growth factor, matrices, and forces combine and control stem cells, *Science* 26 (2009) 1673-1677.
- [9] Z. Kuihua, W. Chunyang, F. Cunyi, M. Xiumei, Aligned SF/P(LLA-CL)-blended nanofibers encapsulating nerve growth factor for peripheral nerve regeneration, *J. Biomed Mater Res Part A* 102A (2014) 2680-2691.
- [10] P.J. Johnson, S. L. Skornia, S. E. Stabenfeldt, R. K. Willits, Maintaining bioactivity of NGF for controlled release from PLGA using PEG, *Journal of Biomedical Materials Research* 86A (2008) 420-427.
- [11] C.M. Valmikinathan, S. Defroda, X. Yu, Polycaprolactone and Bovine Serum Albumin Based Nanofibers for Controlled Release of Nerve Growth Factor, *Biomacromolecules* 10 (2009) 1084-1089.
- [12] I.C. Liao, S.Y. Chew, K.W. Leong, Aligned core-shell nanofibers delivering bioactive proteins, *Nanomedicine* 1 (2006) 465-471.
- [13] N. Han, J. Johnson, J. J. Lannutti, J. O. Winter, Hydrogel–electrospun fiber composite materials for hydrophilic protein release, *Journal of Controlled Release* 158 (2012) 165–170.
- [14] J.M Péan, F. Boury, M.C. Venier-Julienne, P. Menei, J.E. Proust, J.P Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres? *Pharmaceutical Research* 16 (1999) 1294-1299.
- [15] T. Morita, Y. Horikiri, H. Yamahara, T. Suzuki, H. Yoshino,

Formation and isolation of spherical fine protein microparticles through lyophilization of protein-poly(ethylene glycol) aqueous mixture, *Pharmaceutical Research* 17 (2000) 1367–1373.

[16] Y.P. Li, M. Ogris, J. Pelisek, W. Roedl, Stability and release characteristics of poly(D,L-lactide-co-glycolide) encapsulated CaPi-DNA coprecipitation, *International Journal of Pharmaceutics* 269 (2004) 61–70.

[17] R.L. Davidson, K.A. O'Malley, T.B. Wheeler, Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration, *Somatic Cell and Molecular Genetics* 2 (1976) 271-80.

[18] R. D. Lane, A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomes, *Journal of Immunological Methods* 81 (1985) 223-228.

[19] R. Bamba, D.C. Riley, N.D. Kelm, M.D. Does, R.D. Dortch, W.P. Thayer, A novel technique using hydrophilic polymers to promote axonal fusion, *Neural Regeneration Research* 11 (4) (2016) 525–528.

[20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunology Methods* 65 (1983) 55-63.

[21] K.A.F. O'Brien, P.A. Jones, J. Rockley, Evaluation of an agarose overlay assay to determine the eye irritation potential of detergent-based products, *Toxicology in Vitro* 4 (4/5) (1990) 311-313.

[22] D. Vaudry, P. J. S. Stork, P. Lazarovici, L. E. Eiden, Signaling Pathways for PC12 Cell Differentiation: Making the Right Connections, *Science* 296 (2002) 1648-1649.

[23] M.H. Huang, S. Li, D.W. Hutmacher, J. Coudane, M. Ver, Degradation characteristics of poly(ϵ -caprolactone)-based copolymers and blends, *Journal of Applied Polymer Science* 102 (2) (2006) 1681–1687.

[24] K.L. Liu, E. Widjaja, Y. Huang, X. W. Ng, S.C.J. Loo, F.Y.C. Boey, S.S Venkatraman. A New Insight for an Old System: Protein-PEG

Colocalization in Relation to Protein Release from PCL/PEG Blends, *Molecular Pharmaceutics* 8 (6) (2011) 2173-2182.

[25] Y. Zhu, N.H. Shah, A.W. Malick, M.H. Infeld, J.W. McGinity, Solid-state plasticization of an acrylic polymer with chlorpheniramine maleate and triethyl citrate, *International Journal of Pharmaceutics* 241 (2) (2002) 301–310.

[26] M. Baiardo, G. Frisoni, M. Scandola, M. Rimelen, D. Lips, K. Ruffieux, Thermal and mechanical properties of plasticized poly(lactic acid). *Journal of Applied Polymer Science* 90 (7) (2003) 1731-1738.

[27] A.N. Ghebremeskel, C. Vemavarapu, M. Lodaya, Use of surfactants as plasticizers in preparing solid dispersions of poorly soluble API: Selection of polymer–surfactant combinations using solubility parameters and testing the processability, *International Journal of Pharmaceutics* 328 (2) (2007) 119-129.

[28] T. Mekonnen, P. Mussone, H. Khalil, D. Bressler, Progress in bio-based plastics and plasticizing Modifications, *Journal of Materials Chemistry A* 1 (2013) 13379–13398.

[29] Y.I. Yoon, K. E. Park, S.J. Lee, W. H. Park. Fabrication of Microfibrous and Nano-/Microfibrous Scaffolds: Melt and Hybrid Electrospinning and Surface Modification of Poly(L-lactic acid) with Plasticizer, *BioMed Research International* 2013 (2013) 1-10.

[30] X. Wei, Z. Xia, S.C. Wong, A. Baji, Modelling of mechanical properties of electrospun nanofibre network, *International Journal of Experimental and Computational Biomechanics* 1 (2009) 45-57.

[31] L.Y. Wan, H. Wang, W. Gao, F. Ko, An analysis of the tensile properties of nanofiber mats, *Polymer* 73 (2015) 62-67.

[32] S.C. Wong, A. Baji, S.W. Leng, Effect of fiber diameter on tensile properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone), *Polymer* 21 (2008) 4713-4722.

[33] S. Ifukua, A. Ikutaa, H. Izawaa, M. Morimotob, H. Saimotoa, Control of mechanical properties of chitin nanofiber film using glycerol

without losing its characteristics, *Carbohydrate Polymers* 101 (2014) 714-717.

[34] F.M. Veronese, A. Mero, The impact of PEGylation on biological therapies, *Biodrugs* 22 (5) (2008) 315-329.

[35] M.C. Serrano, R. Pagani, M. Vallet-Regí, J. Peña, A. Rámila, I. Izquierdo, M.T. Portolés, In vitro biocompatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts, *Biomaterials* 25 (2004) 5603–5611.

[36] E. Walter, K. Moelling, J. Pavlovic, H.P. Merkle, Microencapsulation of DNA using poly(DL-lactide-co-glycolide): stability issues and release characteristics, *Journal of Controlled Release* 61 (1999) 361–374.

[37] E.H. Sanders, R. Kloefkorn, G.L. Bowlin, D.G. Simpson, G.E. Wnek, Two-phase electrospinning from a single electrified jet: microencapsulation of aqueous reservoirs in poly(ethylene-co-vinyl acetate) fibers, *Macromolecules* 36 (2003) 3803–3805.

[38] H. Yu, Y. Jia, C. Yao, Y. Lu, PCL/PEG core/sheath fibers with controlled drug release rate fabricated on the basis of a novel combined technique, *International Journal of Pharmaceutics* 469 (2014) 17-22.

[39] L.A. Pfister, E. Alther, M. Papaloizos, H.P. Merkle, B. Gander, Controlled nerve growth factor release from multi-ply alginate/chitosan-based nerve conduits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 (2008) 563–572.

[40] H. Yu, J. Liu, J. Ma, L. Xiang, Local delivery of controlled released nerve growth factor promotes sciatic nerve regeneration after crush injury, *Neuroscience Letters* 566 (2014) 177–181.

[41] R. De Boer, A.M. Knight, R.J. Spinner, M.J. Malessy, M.J. Yaszemski, A.J. Windebank, In vitro and in vivo release of nerve growth factor from biodegradable poly-lactic-co-glycolic-acid microspheres, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95 (2010) 1067–1073.

[42] A. Repanas, W.F. Wolkers, O. Gryshkov, M. Müller, B. Glasmacher, PCL/PEG Electrospun Fibers as Drug Carriers for the Controlled Delivery of Dipyridamole, *Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology* 1 (2) (2015) 1-10.