**Universidade de Aveiro**
**2018**

Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

**Joana Patrícia Marques de Sousa**

# Nanofibras eletrofiadas compósitas com grafeno para regeneração neural

**Universidade de Aveiro**
**2017**

Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica

**Joana Patrícia Marques de Sousa**

# Nanofibras eletrofiadas compósitas com grafeno para regeneração neural

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques, equiparada a Investigadora Principal do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e co-orientação da Doutora Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Ciências Médicas da Universidade de Aveiro

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
COMPETE 2020
CENTRO 2020
PORTUGAL 2020
UNIÃO EUROPEIA Fundos Europeus Estruturais e de Investimento

**O júri**

| | |
|---|---|
| Presidente | Professora Doutora Maria Elisabete Jorge Vieira da Costa<br>Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro |
| Vogal - Arguente Principal | Doutor Filipe José Alves de Oliveira<br>Equiparado a Investigador Principal, Universidade de Aveiro |
| Vogal - Orientador | Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques<br>Equiparada a Investigadora Principal, Universidade de Aveiro |

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer às minhas orientadora e co-orientadora, Doutora Paula Alexandrina de Aguiar Pereira Marques e Doutora Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira, por me possibilitarem a realização deste trabalho de investigação, pela inspiração e pelos conselhos.

Ao André Girão, pelo acompanhamento e orientação ao logo de todo percurso e pela amizade.

À Patrícia Correia, pelo apoio cedido durante a realização da cultura celular.

À Ângela Semitela, à Susana Pinto, ao Nuno Almeida e ao Gonçalo Ramalho pelos conselhos e momentos bem passados.

A todas as minha amigas e colegas de mestrado pela partilha de experiências.

Ao Rui Barbosa, pelo apoio, motivação e compreensão.

Ao meu irmão, David, pela curiosidade e interesse no meu trabalho.

Aos meus pais, por me possibilitarem este percurso académico e por serem os primeiros a acreditar nas minhas capacidades.

Paula A.A.P. Marques agradece à Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) pelo contrato de investigador IF/00917/2013 e pelo projeto IF/00917/2013/CP1162/CT0016.

Este trabalho contou com o apoio do Centro de Tecnologia Mecânica e Automação (TEMA, UID/EMS/00481/2013-FCT e CENTRO-01-0145-FEDER-022083), da FCT através do projeto IF/00917/2013/CP1162/CT0016, do Instituto de Biomedicina (iBiMED, UID/BIM/04501/2013) e do projeto GoBack - Novos alvos terapêuticos para a lesão medular (PTDC/CVT-CVT/32261/2017).

**Palavras-chave**

Engenharia de Tecidos, *Scaffold*, Eletrofiação, Óxido de Grafeno, Neurorregeneração

**Resumo**

Nos últimos anos, a engenharia de tecidos (ET) surgiu como uma abordagem promissora para colmatar os processos insuficientes de regeneração do sistema nervoso (SN) e, consequentemente, atenuar algumas consequências físicas, psicológicas e sociais devastadoras para os pacientes em todo o mundo. O sucesso das estratégias de ET neural depende fortemente da combinação de biomateriais com técnicas avançadas de nanofabricação para o fabrico de *scaffolds* fibrosos capazes de apresentar uma topografia biomimética e uma elevada razão área superficial/volume capaz de melhorar a resposta celular. As excelentes propriedades físico-químicas dos nanomateriais à base de carbono, como o grafeno, encorajaram a sua exploração para a regeneração neural. Para além das propriedades elétricas, óticas e mecânicas inovadoras do grafeno, o óxido de grafeno (GO) apresenta uma superfície altamente funcionalizada por oxigénio, o que confere um caráter hidrofílico ao material e, consequentemente, leva a excelentes características biológicas. Assim, neste trabalho, fabricou-se uma ampla gama de *scaffolds* eletrofiados compósitos de policaprolactona-gelatina-GO para estudar a influência da concentração, tamanho e nível de redução do GO nas propriedades morfológicas, mecânicas, químicas e biocompatibilidade das fibras. Apesar de algumas variações, de um modo geral todos os compósitos apresentaram propriedades morfológicas, mecânicas e de molhabilidade compatíveis com células do tipo neuronal. O *scaffold* com nanofolhas de GO reduzidas apresentou os melhores resultados no ensaio celular com células SH-SY5Y. Os valores de viabilidade obtidos encorajam a realização de culturas celulares superiores a sete dias, ensaios com estimulação elétrica e/ou fatores de diferenciação.

**Keywords**

Tissue engineering, Scaffold, Electrospinning, Graphene Oxide, Neuroregeneration

**Abstract**

In recent years, tissue engineering (TE) has emerged as a promising approach to complete the deficient natural regeneration processes of the nervous systems and consequently attenuate some devastating physical, psychological and social consequences for patients worldwide. The success of neural TE strategies deeply rely on the combination of biomaterials with advanced nanofabrication techniques towards the fabrication of fibrous scaffolds able to present a biomimetic topography and a high surface area/volume ratio capable of enhancing the cell response. The excellent physicochemical properties of carbon-related nanomaterials, such as graphene, have encouraged their exploitation for neural regeneration. Complementary to the ground-breaking electrical, optical and mechanical properties of graphene, graphene oxide (GO) presents a highly oxygen functionalized surface, which impart a hydrophilic character to the material and consequently leads to excellent biologically features. Thus, in this work, we fabricated a wide range of composite electrospun polycaprolactone-gelatin-GO scaffolds to study the influence of concentration, size and reduction level of GO on the morphological, mechanical, chemical properties and biocompatibility of the fibres. In general, all composites showed morphological, mechanical and wettability properties compatible with neuronal-like cell cultures. The scaffold with reduced GO nanosheets showed the best results in the cell culture with SH-SY5Y cells. Viability results encourage cell cultures greater than seven days, electrical stimulation tests and/or addition of differentiation factors.

# Índice

**Lista de Abreviaturas** ..... III
**Lista de Figuras** ..... V
**Lista de Tabelas** ..... IX
**1. Introdução** ..... 1
**1.1. Enquadramento** ..... 1
**1.2. Objetivos** ..... 2
**2. Revisão Bibliográfica** ..... 3
**2.1. Sistema Nervoso - Anatomia e Fisiologia** ..... 3
**2.1.1. Sistema Nervoso Central** ..... 8
**2.1.2. Sistema Nervoso Periférico** ..... 11
**2.2. Sistema Nervoso - Lesão** ..... 12
**2.2.1. Encéfalo** ..... 13
**2.2.2. Espinal Medula** ..... 14
**2.2.3. Nervos Periféricos** ..... 16
**2.3. Sistema nervoso - Tratamento** ..... 18
**2.3.1. Sistema Nervoso Central** ..... 18
**2.3.2. Sistema Nervoso Periférico** ..... 19
**2.4. Engenharia de Tecidos do Sistema Nervoso** ..... 21
**2.4.1. Biomateriais** ..... 22
**2.4.2. Técnicas Avançadas de Microfabricação: Eletrofiação** ..... 24
**2.4.3. *Scaffolds* para Engenharia do Sistema Nervoso: Estado da Arte** 26
**3. Materiais e Métodos** ..... 37
**3.1. Materiais** ..... 37
**3.2. Fabrico dos *Scaffolds*** ..... 38
**3.2.1. Soluções Compósitas** ..... 38
**3.2.2. Eletrofiação** ..... 39
**3.3. Caracterização** ..... 39
**3.3.1. Análise Morfológica** ..... 39
**3.3.2. Ensaios Mecânicos** ..... 39
**3.3.3. Análise Química** ..... 40
**3.3.4. Molhabilidade** ..... 40
**3.4. Biocompatibilidade** ..... 41

**3.4.1. Cultura Celular** ..... 41
**3.4.2. Viabilidade Celular** ..... 42
**3.4.3. Morfologia Celular** ..... 43
**4. Resultados e Discussão** ..... 45
**4.1. Propriedades Morfológicas** ..... 45
**4.2. Propriedades Mecânicas** ..... 49
**4.3. Caracterização Química** ..... 52
**4.4. Molhabilidade** ..... 54
**4.5. Biocompatibilidade** ..... 57
**5. Conclusão e Trabalhos futuros** ..... 63
**6. Bibliografia** ..... 65
**7. Anexos** ..... 71
**7.1. Anexo 1** ..... 71
**7.2. Anexo 2** ..... 71
**7.3. Anexo 3** ..... 71
**7.4. Anexo 4** ..... 72

## Lista de Abreviaturas

| | |
|---|---|
| **$\varepsilon_m$** | Elongação máxima |
| **AA** | Ácido acético |
| **ATR-FTIR** | Transformada de Fourier com modo de refletância total atenuada |
| **DA** | Dextrano-aldeído |
| **E** | Módulo de Young |
| **EM** | Espinal medula |
| **ET** | Engenharia de tecidos |
| **FBS** | Soro bovino fetal |
| **FDA** | Food and Drug Administration |
| **GO** | Óxido de grafeno |
| **LP** | Lesão primária |
| **LS** | Lesão secundária |
| **LTEM** | Lesão traumática da espinal medula |
| **LTNP** | Lesão traumática do nervo periférico |
| **MEC** | Matriz extra celular |
| **MEM** | Meio Essencial Mínimo |
| **SEM** | Microscopia eletrónica de varrimento |
| **NC** | Nanoestruturas de carbono |
| **nGO** | Óxido de grafeno nano |
| **NP** | Nanopartículas |
| **nrGO** | Óxido de grafeno nanoreduzido |
| **PA** | Potencial de ação |
| **PCL** | Policaprolactona |
| **rGO** | Óxido de grafeno reduzido |
| **SBB** | Sudan Black B |
| **SE** | Sinapse elétrica |
| **SNA** | Sistema nervoso autónomo |
| **SN** | Sistema nervoso |
| **SNC** | Sistema nervoso central |
| **SNP** | Sistema nervoso periférico |
| **SNS** | Sistema nervoso somático |
| **SQ** | Sinapse química |

| | |
|---|---|
| **TCE** | Traumatismo cranioencefálico |
| **TFE** | 2,2,2-trifluoroetanol |
| **TR** | Tensão de rotura |
| **XRD** | Cristalografia de raios X |

## Lista de Figuras

Figura 1 - Divisões do Sistema Nervoso. ..... 3
Figura 2 – Células do SN: (a) Neurónio do SNP, (b) oligodendrócito, (c) micróglia, (d) célula de Schwann, (e) astrócito e (f) células ependimárias. ..... 5
Figura 3 – (a) Potencial de ação. (b) Condução contínua de um potencial de ação. ..... 7
Figura 4 – (a) Sinapse química. (b) Sinapse elétrica..... 7
Figura 5 – Sequência de desenvolvimento do encéfalo. ..... 8
Figura 6 - Invólucros meníngeos na EM..... 10
Figura 7 - Organização longitudinal da medula espinhal e representação simplista das suas funções principais. ..... 11
Figura 8 - Anatomia de um nervo periférico. ..... 12
Figura 9 - Fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico. ..... 14
Figura 10 - Consequências fisiológicas após LTEM..... 16
Figura 11 - Representação esquemática da Regeneração Walleriana. ..... 17
Figura 12 - Algoritmo cirúrgico simplificado para reparação do nervo periférico. ..... 20
Figura 13 - Arquiteturas de *scaffolds* para engenharia de tecidos do sistema nervoso. ..... 21
Figura 14 - Esquema de um sistema de eletrofiação com coletor rotativo. ..... 25
Figura 15 - Influência da arquitetura do *scaffold* na adesão e proliferação celular. ..... 26
Figura 16 - Micrografias SEM de células Schwann em *scaffolds* nanofibrosos obtidas no nono dia de cultura celular: (a) nanofibras de PCL; (b) nanofibras de PCL-gelatina..... 27
Figura 17 – Imagens SEM de (a) nanofibras de PCL (b) e nanofibras de PCL revestidas com GO (1.0 mg/mL). Escala: 2 µm. Imagens SEM de (c) células tronco neurais diferenciadas em nanofibras de PCL e (d) nanofibras híbridas após seis dias de cultura. Escala 10 µm. ..... 27
Figura 18 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$ dos *scaffolds* nanofibrosos de PCL-GO..... 29
Figura 19 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$ em função do peso de GO. ..... 30
Figura 20 - Citotoxicidade dos *scaffolds* nanofibrosos. ..... 31

Figura 21 - (a) TR em função da concentração de GO. (b) Curvas tensão-deformação das mantas de DA-GEL e DA-GO-GEL (0.5% (w/w). ..... 32
Figura 22 - Curvas tensão-deformação de amostras de PCL/gelatina, PCL/gelatina/grafeno 1%, PCL/gelatina/grafeno 1,5% e PCL/gelatina/grafeno 2%. ..... 33
Figura 23 - Resultados de MTT de células PC12 em nanofibras de PCL-gelatina e PCL-gelatina-grafeno após 3, 5 e 7 dias de cultura celular. ..... 34
Figura 24 –Imagens de microscopia de fluorescência de células PC-12 em grafeno sem (a) e com (b) estimulação elétrica. Escala 50μm. ..... 34
Figura 25 - a) Comprimento das neurites obtido através da análise de imagens numa área de 8 $mm^2$. b) Histograma que compara a frequência de ocorrência de comprimentos de neurites nas populações estimuladas e não estimuladas…..35
Figura 26 – (a) e (b) curvas tensão-deformação e (c) E de nanofibras de PCL-GO e PCL-rGO contendo diferentes quantidades de GO e RGO. ..... 36
Figura 27 - Suspensão controlo e suspensões com 0.6 wt% de GO, nGO, rGO e nrGO. ..... 38
Figura 28 - Ensaio de tração no equipamento Shimadzu MMT-101N numa amostra do compósito PCL-gelatina-nrGO (1.0 wt%). ..... 40
Figura 29 - Amostras esterilizadas prontas para cultura celular. ..... 42
Figura 30 - Placa com meio com resazurina de amostras e controlos negativos. ..... 43
Figura 31 - Tamanho médio das folhas de GO em função do tempo de ultrasonicação. ..... 45
Figura 32 – Imagens SEM de nanofibras de (a e b) PCL-gelatina e de compósitos com diferentes concentrações de (c - j) GO e (k - r) nGO. ..... 46
Figura 33 - Imagens SEM de nanofibras com diferentes concentrações de (a - h) rGO e (i - p) nrGO. ..... 47
Figura 34 - (a), (b), (c) e (d) distribuição do tamanho dos diâmetros e (e), (f), (g) e (h) diâmetro médio das nanofibras em função do tipo e percentagem de NC. ..... 48
Figura 35 - Curvas tensão-deformação exemplo de nanofibras de PCL-gelatina com diferentes concentrações de (a) GO, (b) nGO, (c) rGO e (d) nrGO. ..... 50
Figura 36 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$, em função da concentração e do tipo NC adicionadas. ..... 51

Figura 37 - Espetro ATR-FTIR da malha de PCL-gelatina e dos compósitos de PCL-gelatina-NC com 0.6 wt% dos quatro tipos de NC. ..... 52
Figura 38 - Espetro Raman da malha de PCL-gelatina e dos compósitos de PCL-gelatina-NC com 0.6 wt% dos quatro tipos de NC. ..... 53
Figura 39 - Evolução do ângulo de contacto de nanofibras de PCL-gelatina e de compósitos de PCL-gelatina com 0,6 wt% de NC ao longo do tempo. ..... 54
Figura 40 - Ângulo de contacto de nanofibras de PCL-gelatina e de compósitos de PCL-gelatina com 0,6 wt% de NC aos 0, 2, 5 e 10 segundos. ..... 56
Figura 41 - Imagens de microscopia confocal de (a) uma amostra de PCL-gelatina-nrGO não submetida ao protocolo de imunocitoquímica e (b) e (c) de amostras de PCL-gelatina-rGO, submetidas ao protocolo de imunocitoquímica (núcleo a azul e F-actina a vermelho), sem e com SBB, respetivamente. ..... 57
Figura 42 - Efeito das nanofibras com diferentes NC na morfologia das células SH-SY5Y através de microscopia confocal. O núcleo das células encontra-se marcado a azul enquanto que a actina filamentosa (F-actina) se encontra marcada a vermelho. ..... 58
Figura 43 - Imagens SEM de células SH-SY5Y em nanofibras de PCL-gelatina e em compósitos de PCL-gelatina com GO e nGO. ..... 59
Figura 44 - Imagens SEM de células SH-SY5Y em compósitos de PCL-gelatina com rGO e nrGO. ..... 60
Figura 45 – (a) e (b) Efeito das nanofibras na viabilidade celular das SH-SY5Y. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas (p<0,05). ..... 61

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Função das principais estruturas do encéfalo. ..... 9
Tabela 2 - Classificação das LTNP. ..... 17
Tabela 3 - Efeitos de parâmetros de eletrofiação na morfologia da fibra.. ..... 25
Tabela 4 - E, TR e $\varepsilon_m$ de nanofibras de gelatina com diferentes quantidades de GO..... 31
Tabela 5 - Valores de impedância e condutividade de nanofibras com diferentes percentagens de grafeno. ..... 33
Tabela 6 - Suspensões de PCL-gelatina-NC..... 38

# 1. Introdução

## 1.1. Enquadramento

O SN é responsável por detetar estímulos, analisá-los, determinar as respostas adequadas e implementá-las por meio de contrações musculares ou secreções glandulares. [1,2] Assim, uma lesão pode significar problemas de processamento sensorial, cognição, comunicação e saúde mental, quando o órgão afetado é o encéfalo, e perda permanente de funcionalidade a nível sensorial e/ou motor, quando a lesão é na espinal medula (EM) ou nos nervos periféricos, o que traz consequências físicas, psicológicas e sociais devastadoras para os pacientes. [3–6]

Atualmente não existem tratamentos capazes de restaurar totalmente a fisiologia do SN, sendo que o bem-estar dos pacientes é assegurado por tratamentos paliativos e de reabilitação, que acarretam custos avultados para os sistemas de saúde. [7–9]

Nesse sentido, têm surgido nos últimos anos várias estratégias de ET capazes de associar células, biomoléculas, biomateriais e técnicas avançadas de microfabricação no fabrico de *scaffolds* 3D biocompatíveis e biodegradáveis. Estes microambientes celulares têm o objetivo de combinar uma porosidade, uma permeabilidade e uma nanotopografia adequadas com propriedades elétricas, químicas e mecânicas que repliquem as da matriz extracelular (MEC) do SN, de modo a promover uma resposta celular otimizada e assim regenerar as zonas lesadas.[10–12] A MEC do SN possui dois componentes principais: a matéria cinzenta e a matéria branca, onde estão localizados os corpos e os axónios dos neurónios, respetivamente. Assim, *scaffolds* fibrosos têm sido amplamente utilizados como potenciais plataformas para guiar os axónios das células nervosas, já que possuem para além da topografia adequada, uma razão área superficial/volume extremamente alta, tornando-as um potencial transportador de medicamentos para terapia química e intensificando a absorção das células ao scaffold.[13]

Os materiais que têm sido utilizados para a produção de *scaffolds* fibrosos são maioritariamente polímeros como, por exemplo, a policaprolactona (PCL), o colagénio ou gelatina. [13,14]

Recentemente, as excelentes propriedades físico-químicas de materiais à base de carbono, como o grafeno, encorajam a sua exploração como materiais atraentes para a regeneração neural. O óxido de grafeno (GO), o principal derivado do grafeno, para além das excelentes propriedades mecânicas, apresenta uma grande habilidade para adsorver moléculas devido à presença de grupos funcionais oxigenados, que conferem também um caráter hidrofílico ao material, permitindo maior dispersibilidade e menor tendência a formar agregados capazes de induzir respostas tóxicas em cenários biológicos.[12,15] Mais importante ainda, é a possibilidade de *scaffolds* contendo GO poderem ser reduzidos de forma ajustável (GO reduzido – rGO) de modo a serem eletricamente estimulados com o intuito de modular o comportamento das células neurais, incluindo a sua adesão, a sua proliferação, a sua migração e a sua diferenciação.[16–18]

## 1.2. Objetivos

Este trabalho teve como principais objetivos:

I. Desenvolvimento de nanofibras compósitas de PCL, gelatina e grafeno por eletrofiação;
II. Análise das propriedades químicas, mecânicas e topográficas das nanofibras em função da composição química (GO e rGO), da concentração e tamanho das nanoestruturas de carbono (NC);
III. Avaliação da interação entre células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e as nanofibras compósitas com propriedades consideradas promissoras para aplicação em ET do SN.

# 2. Revisão Bibliográfica

## 2.1. Sistema Nervoso - Anatomia e Fisiologia

O SN é responsável por detetar estímulos internos e externos - função sensitiva -, analisá-los e determinar as respostas adequadas - função integradora - e implementá-las por meio de contrações musculares ou secreções glandulares - função motora. [1,2]

O SN pode ser fisiologicamente dividido em duas partes (Figura 1): sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é constituído pelo encéfalo e pela EM, respetivamente localizados no crânio e no canal vertebral, e é responsável por interpretar sinais e gerar estímulos excitatórios para o SNP. Por usa vez, o SNP consiste numa coleção de nervos, recetores sensoriais e gânglios que conectam o SNC com as estruturas periféricas do corpo. [19–22]

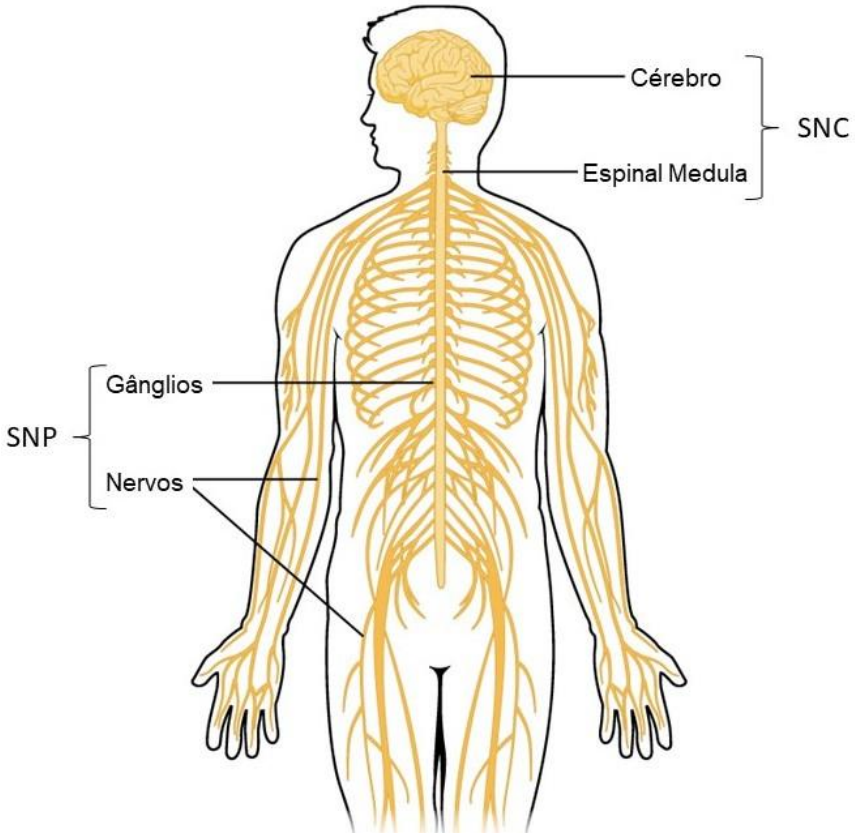



Figura 1 - Divisões do Sistema Nervoso. (Adaptado de [22])

O SN é formado por dois tipos principais de células – neurónios e células da glia. Os neurónios [Figura 2 a)] são as unidades estruturais e funcionais básicas do sistema nervoso, sendo responsáveis por receber estímulos, conduzir potenciais de ação (PA) e transmitir sinais para outros neurónios ou órgãos efetores. Os neurónios possuem um corpo celular, onde se localiza o núcleo, e dois tipos de ramificações - dendrites e um axónio. As dendrites são ramificações que se estendem a partir do citoplasma do corpo celular e cuja função é receber informações de outros neurónios ou de recetores sensoriais e transmiti-las para o corpo celular. Já os axónios conduzem potenciais de ação de ou para o SNC, conforme se trate de neurónios motores ou sensoriais, respetivamente, sendo também responsáveis por transmitir potenciais de ação de uma parte do cérebro ou EM para outra.[19,23,24] Por outro lado, as células da glia [Figura 2 b), c), d), e), e f)] são células de sustentação do sistema nervoso que auxiliam os neurónios nas suas funções, sendo elas: [19,25]:

- Células de Schwann: formação de camadas de mielina em torno dos axónios no SNP;
- Oligodendrócitos: formação de camadas de mielina em torno dos axónios no SNC;
- Micróglias: remoção de materiais estranhos e degenerados;
- Astrócitos: regulação da passagem de moléculas do sangue para o encéfalo;
- Células ependimárias: revestimento dos ventrículos do encéfalo e do canal central da EM;
- Gliócitos ganglionares: suporte dos corpos celulares de neurónios no interior dos gânglios no SNP.

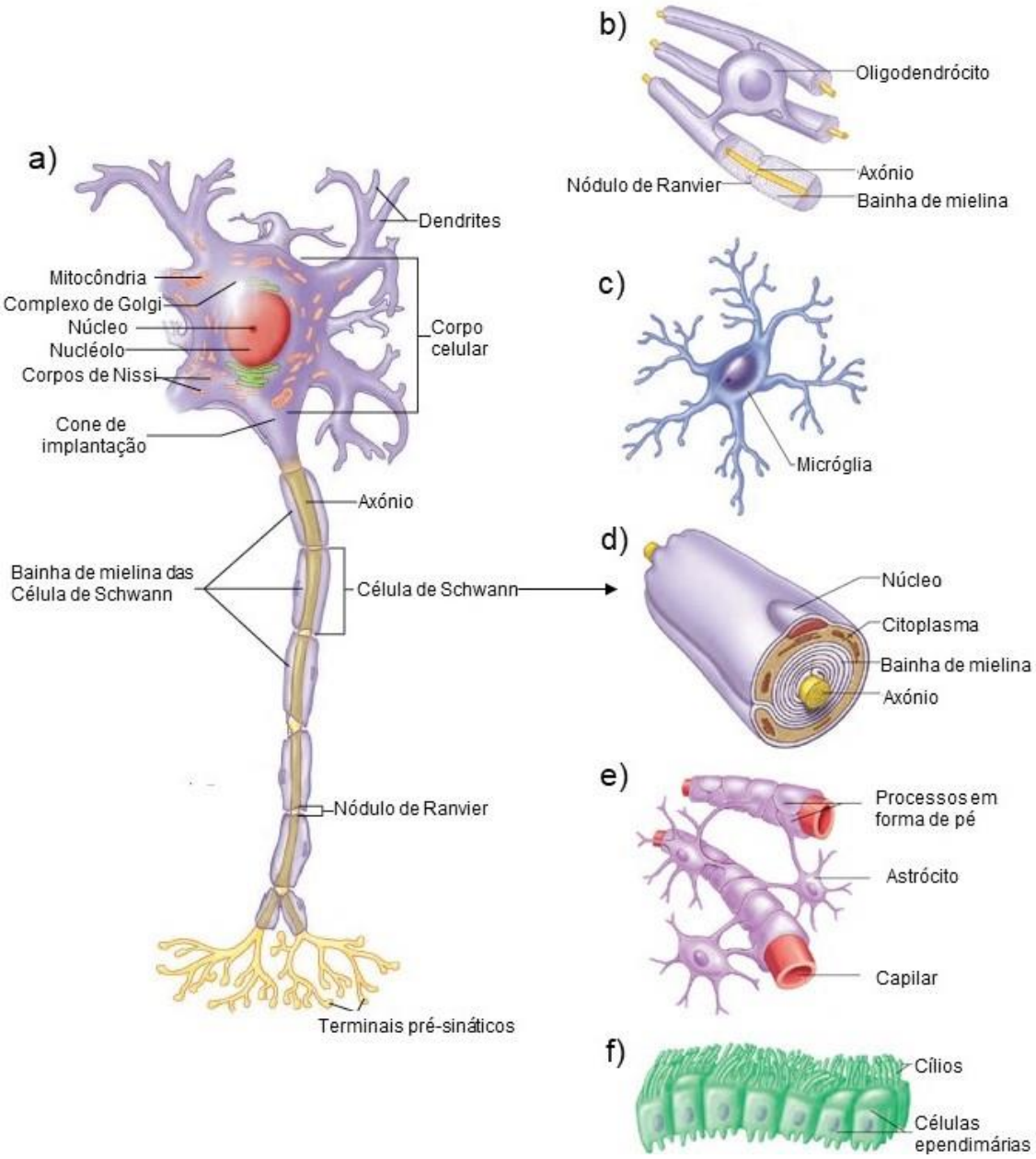



Figura 2 – Células do SN: (a) Neurónio do SNP, (b) oligodendrócito, (c) micróglia, (d) célula de Schwann, (e) astrócito e (f) células ependimárias. (Adaptado de [25])

As células nervosas comunicam entre si através de sinais elétricos, os chamados PA [Figura 3 a)]. Quando uma célula nervosa está em repouso, o seu interior está carregado negativamente em relação ao meio extracelular – potencial de repouso da membrana (-70 mV). Essa diferença de polaridade acontece porque dentro da célula existe uma maior concentração de moléculas carregadas negativamente, que são restritas ao interior da célula (não conseguem atravessar a membrana celular). Em contrapartida, os iões sódio

($Na^+$) e potássio ($K^+$) são difusíveis pela membrana celular e são essas diferenças de concentração que desencadeiam os PA. Quando a célula está em repouso, o seu interior tem uma maior concentração de $K^+$ e o meio extracelular possui uma maior concentração de $Na^+$. Ao receber um estímulo, canais de $Na^+$ localizados na membrana do neurónio abrem-se e o $Na^+$, por difusão, entra na célula, tornando o seu interior menos negativo. Quando o potencial de membrana atinge um certo limiar (-55 mV), outros canais de $Na^+$ dependentes de voltagem abrem-se permitindo a entrada de grandes quantidades desse ião na célula, invertendo a sua polaridade (+20 mV) – despolarização – e tornando o interior da célula mais positivo do que o exterior. Ao atingir uma determinada voltagem positiva, os canais de $Na^+$ fecham-se e abrem-se canais de $K^+$ que, por difusão entra na célula, restaurando a sua polaridade – repolarização. A entrada de $K^+$ em grande quantidade hiperpolariza a célula, tornando-a ainda mais negativa do que no começo do processo (-90 mV). Bombas de sódio-potássio restauram as quantidades iniciais desses iões dentro e fora da célula (cada bomba transporta três $Na^+$ para o exterior da célula e dois $K^+$ para o interior, com gasto de energia), garantindo novamente o potencial de repouso da membrana celular. Isto vai acontecendo em porções da membrana celular ao longo de todo o neurónio [Figura 3 b)] e são estas alterações de potencial de membrana que permitem a transmissão dos impulsos nervosos pelo corpo. [25,26]

O impulso nervoso pode ser transmitido de um neurónio para outro ou de um neurónio para um órgão efetor (músculo ou glândula) através de um processo chamado sinapse nervosa. Existem dois tipos de sinapses nervosas: sinapse química (SQ) [Figura 4 a)] e sinapse elétrica (SE) [Figura 4 b)]. As SQ são unidirecionais e são mediadas por neurotransmissores. Quando o PA chega às arborizações terminais do axónio, vesiculas que armazenam neurotransmissores fundem-se com a membrana pré-sinática, libertando-os na fenda sinática. Esses neurotransmissores ligam-se a proteínas recetoras específicas no neurónio pós-sinático. Se os neurotransmissores forem excitatórios, irão gerar um PA no neurónio pós-sinático, se forem inibitórios hiperpolarizarão o neurónio pós-sinático, inibindo a transmissão do impulso nervoso. Já nas SE, existem junções comunicantes (proteínas chamadas conexinas) entre os neurónios pré e pós

sináticos que permitem a passagem de iões diretamente entre um neurónio e outro. Este tipo de sinapse permite uma transmissão bidirecional.[19,25]

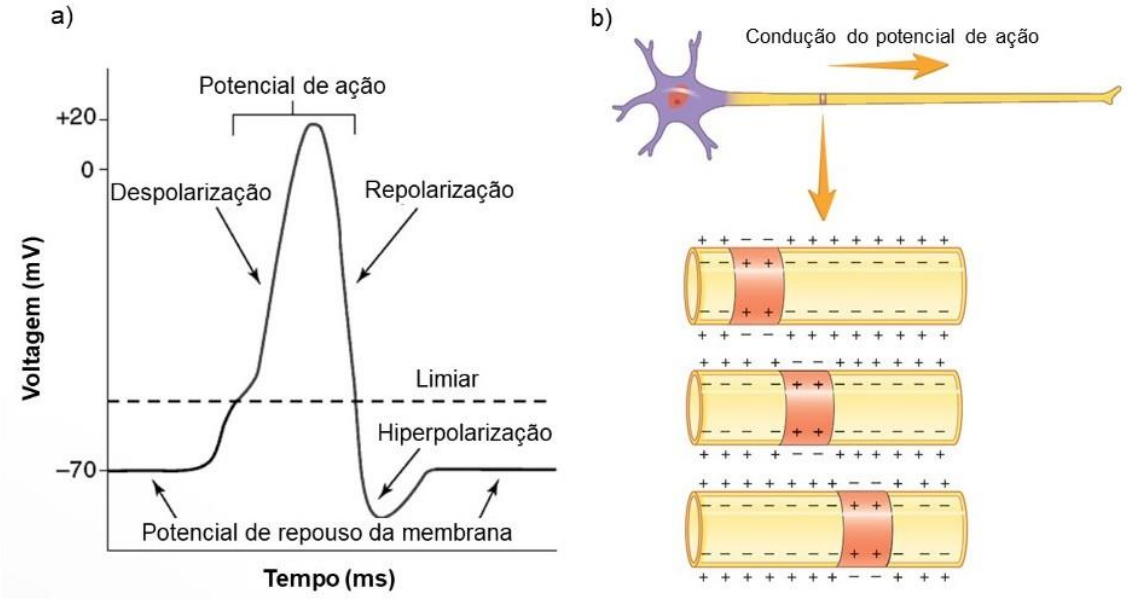



Figura 3 – (a) Potencial de ação. (b) Condução contínua de um potencial de ação. (Adaptado de [25])

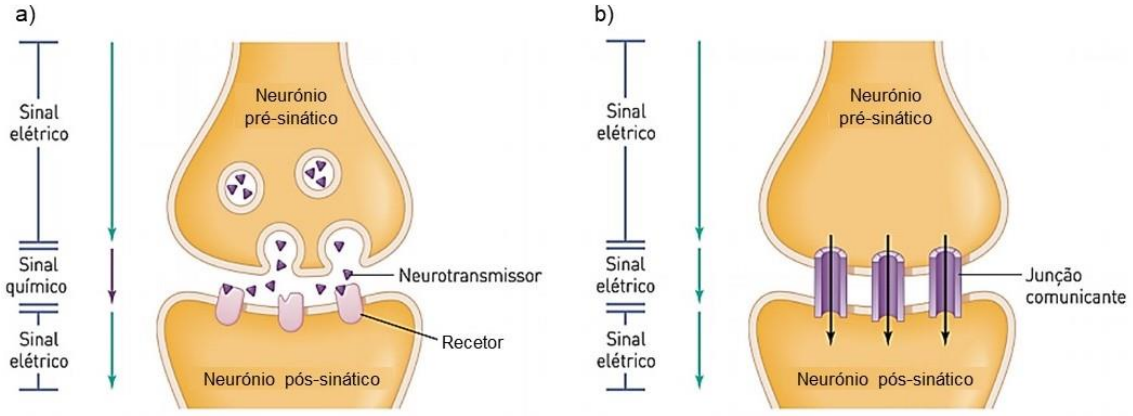



Figura 4 – (a) Sinapse química. (b) Sinapse elétrica.

(Copyright © 2005 Pearson Education, Inc., publicando como Benjamin Cummings)

### 2.1.1. Sistema Nervoso Central

No SNC, o encéfalo é protegido por uma estrutura óssea fixa – o crânio – e a EM encontra-se dentro da coluna vertebral flexível. Ambos são envolvidos por três membranas de tecido conjuntivo, chamadas meninges, que são conhecidas, do exterior para o interior, por *dura-máter*, *aracnóide-máter* e *pia-máter*. A *dura-máter* consiste numa bainha resistente composta principalmente por tecido conjuntivo denso e a *aracnóide-máter* é uma membrana delicada em forma de rede. Entre elas encontra-se o líquido cérebro-espinal, que protege o SNC de lesões mecânicas, distribuindo a força dos choques por uma grande área, e ajudando na remoção de resíduos metabólicos de tecido nervoso. A *pia-máter* é composta por tecido conjuntivo frouxo modificado, é altamente vascularizada e tem como função dar suporte aos vasos que nutrem as células nervosas.[19]

Em termos de desenvolvimento embrionário, o encéfalo pode ser dividido em três partes principais: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. [21] Mais tarde, essas estruturas originam outras (Figura 5) que desempenham funções vitais para o funcionamento do corpo humano (Tabela 1)

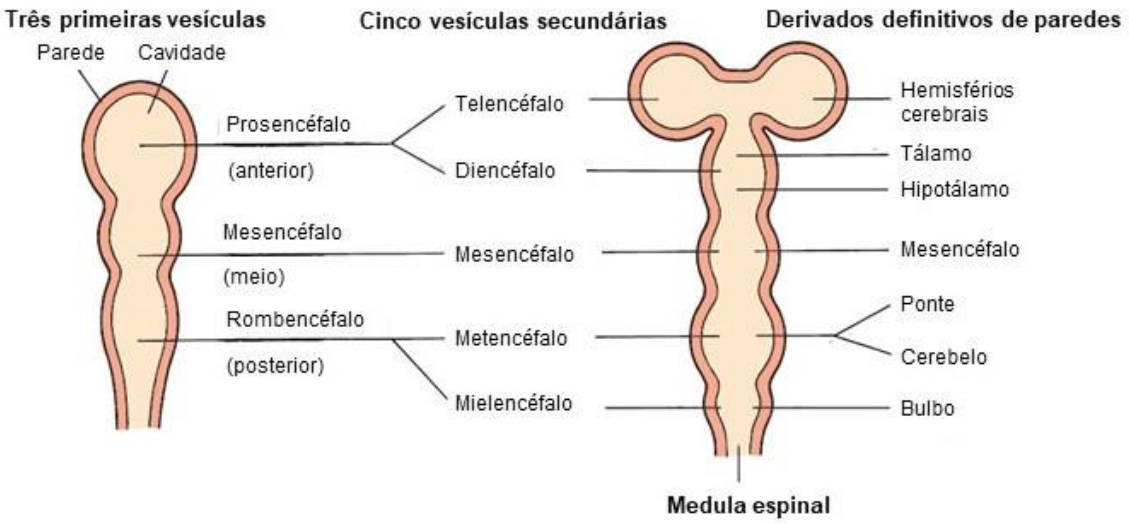



Figura 5 – Sequência de desenvolvimento do encéfalo. (Adaptado de [19])

Tabela 1 - Função das principais estruturas do encéfalo. [19]

| Região durante o desenvolvimento | Região no adulto | Estrutura | Função |
|---|---|---|---|
| **Prosencéfalo** | Telencéfalo | Cérebro | Atividades sensitivas, sensoriais e motoras; raciocínio, memória e inteligência; funções sensitivas e límbicas |
| | Diencéfalo | Tálamo | Centro retransmissor; interpretação sensorial; respostas autónomas para a dor |
| | | Hipotálamo | Regula: fome, sede, temperatura corporal, batimentos cardíacos, etc; controla a glândula hipófise anterior; funções instintivas e límbicas |
| | | Hipófise | Regula outras glândulas endócrinas |
| **Mesencéfalo** | Mesencéfalo | Colículo superior | Reflexos visuais |
| | | Colículo inferior | Reflexos auditivos |
| | | Pedúnculos cerebrais | Coordenação dos reflexos |
| **Rombencéfalo** | Metencéfalo | Cerebelo | Coordenação motora e do equilíbrio |
| | | Ponte | Centro retransmissor |
| | Mielencéfalo | Bulbo | Centro retransmissor |

A EM, assim como o encéfalo, é composta por duas substâncias - substância cinzenta, localizada centralmente, e substância branca, que envolve a cinzenta – sendo rodeada pelas três meninges (Figura 6). A substância cinzenta é formada por corpos de células nervosas, fibras amielínicas e células da glia. A substância branca é composta por feixes, ou tratos, de axónios motores e sensitivos. [23,24]

A medula tem duas funções principais:

1. Conduzir impulsos nervosos: os tratos (feixes de fibras) descendentes conduzem impulsos motores do encéfalo para os músculos e glândulas e os tratos ascendentes conduzem impulsos dos recetores sensitivos periféricos para o encéfalo.

2. Integrar reflexos: é responsável pelos movimentos reflexos dos músculos que controlam a frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão sanguínea, atividades digestivas etc. [19]

A EM está situada dentro da coluna vertebral e estende-se desde a base do cérebro até às primeiras vértebras lombares (L1-L2), como é possível observar na Figura 7. Compreende trinta e um nervos espinais: oito cervicais, doze torácicos, cinco lombares, cinco sacrais e um coccígeo. Devido à diferença de comprimento entre a coluna vertebral e a EM, o que ocorre porque a primeira cresce mais rápido do que a segunda, os níveis neurológicos não correspondem necessariamente aos segmentos vertebrais.[10,27]

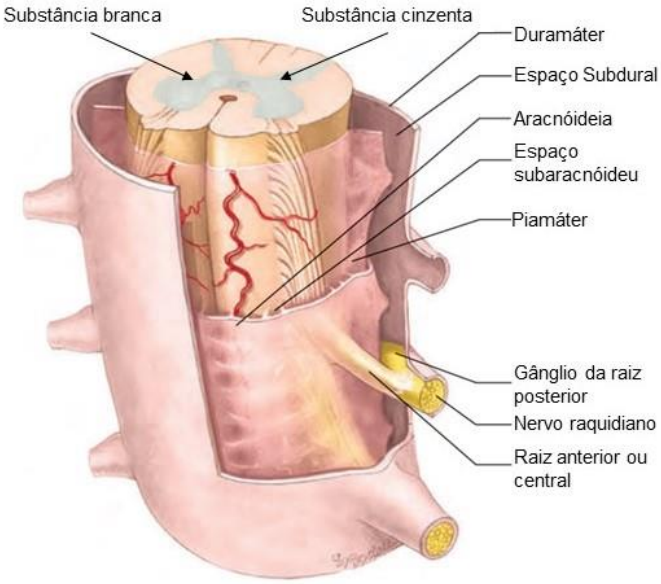



Figura 6 - Invólucros meníngeos na EM. (Adaptado de [9])

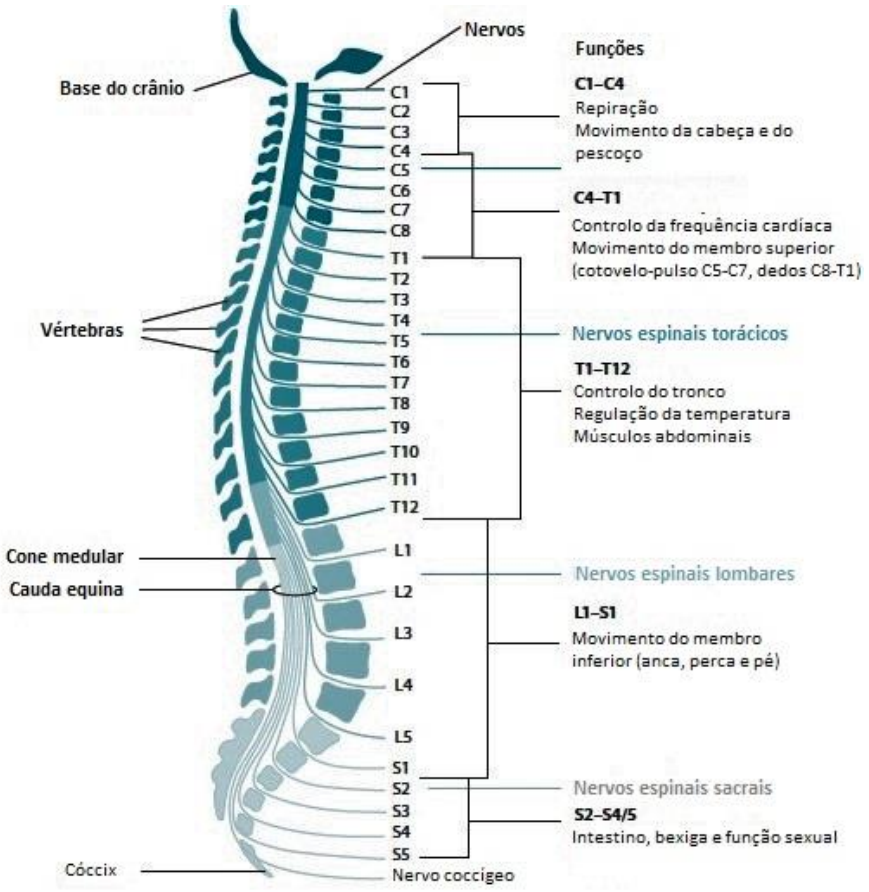



Figura 7 - Organização longitudinal da medula espinhal e representação simplista das suas funções principais. (Adaptado de [27])

### 2.1.2. Sistema Nervoso Periférico

O SNP consiste em todos os recetores sensoriais, nervos, gânglios e plexos localizados fora do SNC. O SNP coleta informações de numerosas fontes, tanto no interior quanto na superfície do corpo, e transmite-as através de neurónios sensoriais para o SNC, onde um dos três resultados é possível: a informação é ignorada, é desencadeado um reflexo ou a informação é avaliada mais extensivamente. Os neurónios motores retransmitem informações do SNC para músculos e glândulas em várias partes do corpo, regulando a atividade nessas estruturas. [23]

O SNP pode ser subdividido ainda em sistema nervoso somático (SNS) e sistema nervoso autónomo (SNA). O SNS é a porção considerada voluntária, onde as respostas podem ser controladas conscientemente, uma vez que envolve a condução de impulsos motores do SNC até aos músculos esqueléticos. Já o SNA é considerado involuntário pois consiste na condução de impulsos ao músculo liso, músculo cardíaco e glândulas. [2]

Os nervos do SNP são constituídos por axónios, células de Schwann e tecido conjuntivo e são alimentados por artérias que entram no tronco nervoso. Cada axónio (Figura 8) é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo frouxo chamada endoneuro, cuja matriz é constituída por fibras de colagénio. Os feixes de axónios agrupados em fascículos são, por sua vez, rodeados por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, o perineuro. Por fim, a superfície externa de um nervo é uma camada circundante, também de tecido conjuntivo, chamada epineuro. [4,22,28]

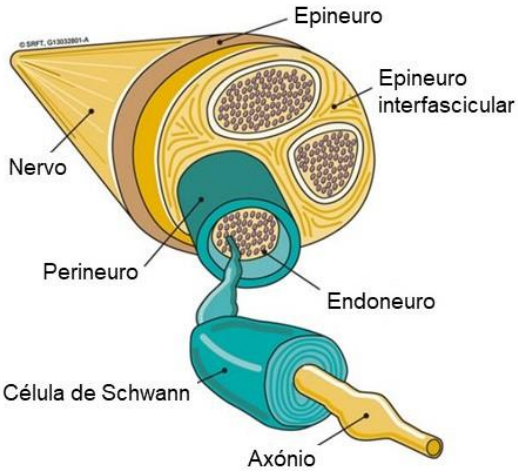


Figura 8 - Anatomia de um nervo periférico. (Adaptado de [28])

## 2.2. Sistema Nervoso - Lesão

O SNP e o SNC possuem ambientes celulares distintos que respondem de maneira diferente a um trauma. No SNP, axónios lesados podem ser reparados caso o corpo celular permaneça intacto e se a célula mielinizante for uma célula de Schwann. Isto acontece porque estas células proliferarem após lesão e os seus neurilemas formam tubos de regeneração onde há secreção de citocinas que promovem o crescimento celular.[2,29] Contrariamente, no SNC, os axónios são mieliniazados por oligodendrócitos que não formam neurilemas para ajudar na regeneração e não sobrevivem após uma lesão de axónio. Além disso, no SNC, os fibroblastos e as células gliais e endoteliais criam um ambiente de reparação inibitório, pois formam uma cicatriz glial que retarda a infiltração de macrófagos - células que eliminam os detritos - atuando como uma barreira mecânica e química para a regeneração de axónios. [29–31]

### 2.2.1. Encéfalo

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é uma forma de lesão cerebral adquirida que ocorre quando um trauma repentino causa danos ao cérebro. O TCE pode resultar do impacto violento da cabeça com um objeto ou da perfuração do crânio por um objeto.[3]

Dados de 2018 estimam que o TCE tenha uma incidência global de 69 milhões de casos por ano. A taxa de incidência do TCE na América do Norte e na Europa é, em média, de 1299 e 1012 novos casos por cada 100 mil pessoas, respetivamente. [32]

A lesão provocada por um TCE pode ser dividida em duas fases: lesão primária (LP) e secundária (LS). A LP resulta diretamente das forças mecânicas que atuam no crânio no momento do impacto e depende da natureza, magnitude, duração e local de aplicação da força.[33] A LS, tem início poucos minutos após a LP e poderá durar meses, estendendo-se a uma região muito mais alargada do que a LP.[34] A LS consiste numa cascata neurocitotóxica que constitui a principal causa de morte intra-hospitalar após TCE.[35] Nesta segunda fase, ilustrada na Figura 9, ocorre edema, desequilíbrio iónico, libertação de excitotoxinas, isquemia e invasão celular inflamatória.[36,37] Sabe-se, hoje em dia, que pouco pode ser feito quanto à LP mas, em contrapartida o período de evolução da LS fornece uma janela de oportunidade temporal para intervenção terapêutica com o potencial de prevenir ou reduzir danos secundários e melhorar o prognóstico do paciente a longo prazo.[33,34]

Algumas consequências comuns após TCE incluem problemas de cognição (pensamento, memória e raciocínio), processamento sensorial (visão, audição, tato, paladar e olfato), comunicação (expressão e compreensão) e comportamento ou saúde mental (depressão, ansiedade, mudanças de personalidade, agressividade e inadequação social). Em casos mais graves, um TCE pode deixar o indivíduo em coma, estado vegetativo ou até causar a sua morte.[3]

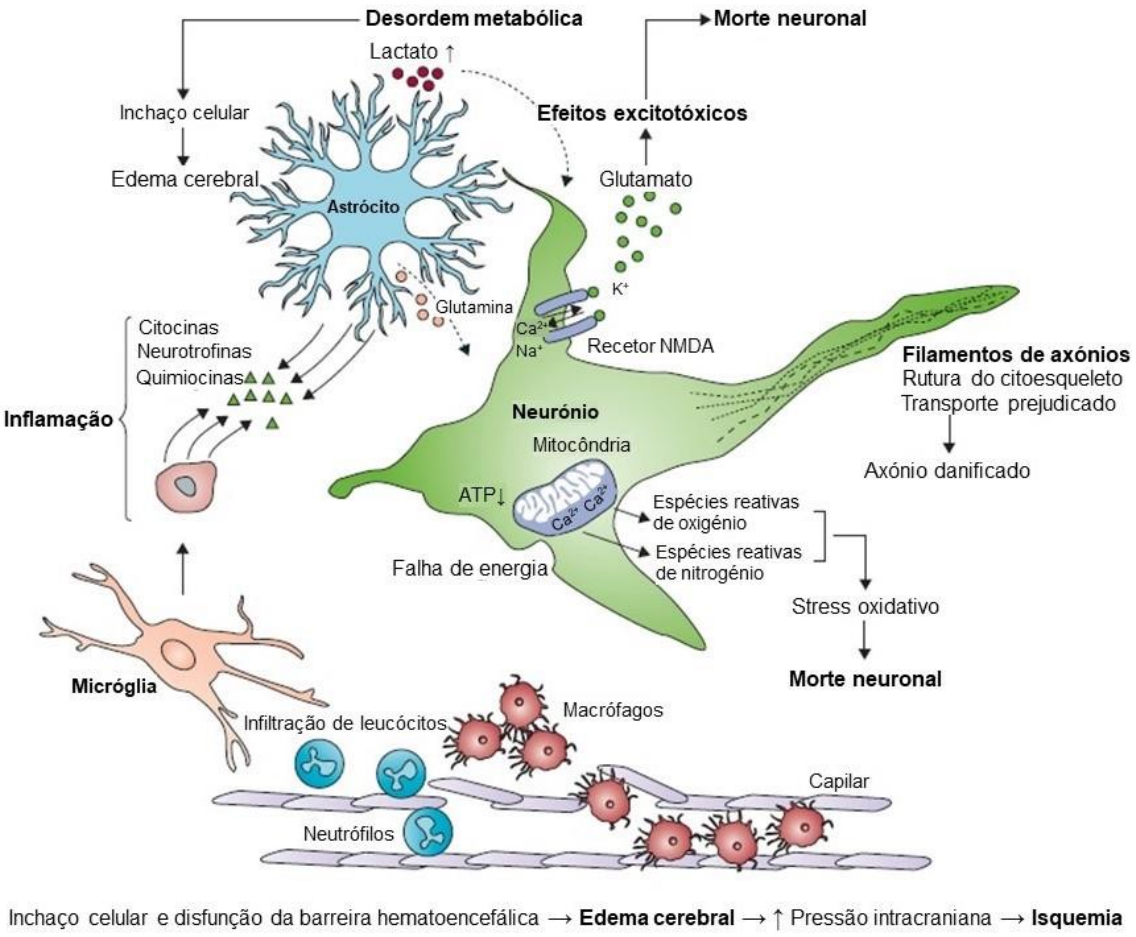



Figura 9 - Fisiopatologia do traumatismo cranioencefálico. (Adaptado de [37])

### 2.2.2. Espinal Medula

A taxa de incidência de lesões traumáticas da EM (LTEM) nos EUA, em 2016, foi de aproximadamente 54 casos por milhão de pessoas ou aproximadamente 17 mil novos casos por ano. A idade média de lesão é de 42 anos e as causas incluem acidentes de viação (38%), quedas (30,5%), atos de violência (13,5%), e atividades desportivas e recreativas (9%), entre outras.[9] Atualmente, não existe um tratamento capaz de restaurar totalmente a fisiologia da EM, assim, o bem-estar dos pacientes é assegurado por tratamentos paliativos e de reabilitação. Estima-se que o custo médio tratamento de um indivíduo com esta potologia até ao fim da sua vida é entre 500 mil e 2 milhões de dólares.[38]

A lesão da EM pode ser traumática ou não traumática. A lesão não traumática é, geralmente, uma consequência de outras patologias como, por exemplo, doenças infeciosas, tumores, doenças músculo-esqueléticas, como osteoartrite, e problemas congénitos, como a espinha bífida. A LTEM resulta de muitas causas diferentes, tais como quedas, acidentes de trânsito, lesões profissionais e desportivas e violência, e consiste numa rutura parcial ou total da integridade estrutural e funcional da EM, resultando em perda sensorial, perda de função motora, ou ambas.[23,27,39]

À semelhança do que acontece no encéfalo, na LTEM ocorrem duas espécies de lesões dos tecidos: LP e LS (Figura 10). A LP corresponde ao trauma mecânico inicial, que envolve um excesso de flexão, extensão, rotação, ou compressão da coluna vertebral. Nesta fase, ocorre a compressão direta de elementos neurais por fragmentos de osso fraturados e deslocados, os vasos sanguíneos são danificados e os axónios e as membranas das células neurais rompem-se. A LS, tem início poucos minutos após a LP e alastra-se a uma maior área. Nesta segunda fase, ocorre isquemia, edema, desequilíbrio iónico, libertação de excitotoxinas, como o glutamato, invasão celular inflamatória (macrófagos) e formação de uma cicatriz glial que ao isolar a área da lesão para prevenir infeções e morte celular, também tem um efeito reverso ao bloquear o restabelecimento da rede neural. [23,36,38]

As consequências da LTEM podem incluir a perda de controlo sensorial, motor, ou ambos, nos membros superiores, inferiores e tronco, e a perda de regulação autonómica (involuntária) do corpo, o que pode afetar a respiração, frequência cardíaca, pressão arterial, função sexual, controlo da temperatura e controlo do intestino e da bexiga. A perda sensorial ocorre quando há lesão nas vias ascendentes da EM para o encéfalo e a perda de função motora é provocada pelo dano nas vias descendentes do encéfalo para os neurónios motores da EM.[23,27]

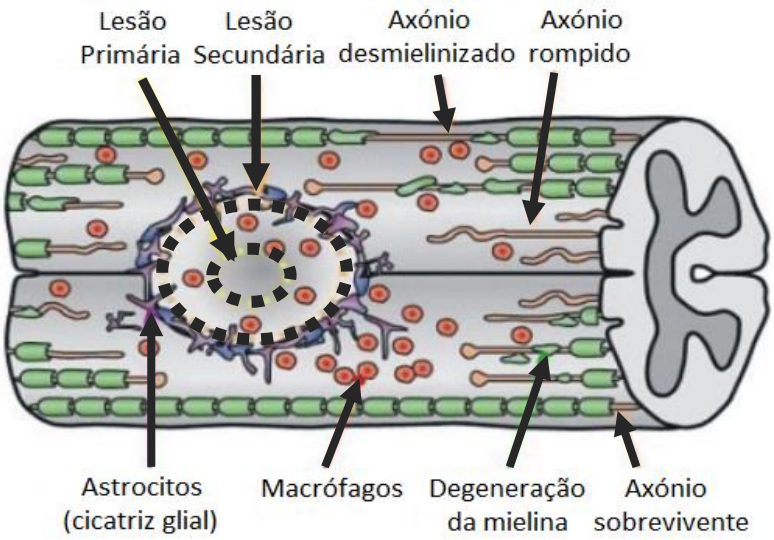



Figura 10 - Consequências fisiológicas após LTEM (Adaptado de [36]).

### 2.2.3. Nervos Periféricos

Quando há uma lesão de um nervo periférico, os impulsos nervosos deixam de ser transmitidos, total ou parcialmente, o que resulta em alterações funcionais sensitivas e motoras que originam dor, desconforto, incapacidade e diminuição da qualidade de vida do paciente.[4]

A etiologia das lesões traumáticas do nervo periférico (LTNP) incluem laceração e contusão (causadas por instrumentos penetrantes ou fragmentos ósseos derivados de fraturas ósseas), tração ou estiramento (resultantes de movimentos exagerados), esmagamento, compressão, choques térmicos e elétricos. [40]

As LTNP são, normalmente, categorizadas consoante o grau de gravidade segundo a classificação de Seddon em neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Tabela 2). Nas LTNP onde há perda de continuidade dos axónios, começa por ocorrer uma série de eventos degenerativos - degeneração Walleriana - para remover o tecido danificado, de forma a abrir caminho para o processo de regeneração (Figura 11). Um a dois dias após LTNP, a extremidade distal da lesão começa a sofrer degeneração através de uma cascata celular mediada via influxo de $Ca^{2+}$ e ativação de calpaínas, seguida por uma limpeza dos detritos celulares promovida por macrófagos e células de Schwann.[40,41] As células de Schwann que permanecem após a lesão proliferam e formam tubos endoneurais, que funcionam como um percurso que promove o crescimento dos

axónios longitudinalmente, contribuindo para a regeneração e reparação do nervo. [42,43] Infelizmente, existem várias barreiras como, por exemplo, presença de corpos estranhos, infeção ou formação de tecido cicatricial, que impedem este mecanismo fisiológico de regeneração de produzir uma recuperação efetiva, tornando a recuperação funcional completa das LTNP incomum.[42]

Tabela 2 - Classificação das LTNP. [4,41,43]

| Classificação | Características Patofisiológicas |
|---|---|
| **Neuropraxia** | Lesão leve, geralmente provocada por compressão ou estiramento.<br>Há lesão da bainha de mielina, mas a bainha axonal é preservada.<br>A recuperação espontânea deve ocorrer dentro de dias ou semanas. |
| **Axonotmese** | Há perda de continuidade dos axónios e ocorre degeneração Walleriana distalmente ao local da lesão.<br>Pode ocorrer recuperação espontânea ou ser necessária intervenção cirúrgica, dependendo do grau de desorganização do nervo e da distância ao órgão terminal. |
| **Neurotmese** | Tipo mais grave de lesão onde se verifica a perda de continuidade dos axónios bem como de todo o tecido de suporte.<br>É normalmente causada por lesões lacerantes.<br>É necessária intervenção cirúrgica. |

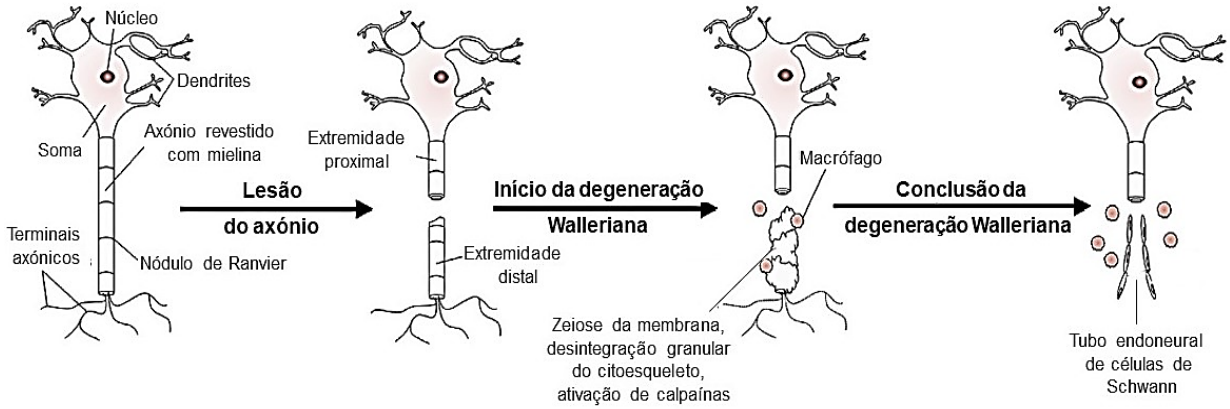



Figura 11 - Representação esquemática da Regeneração Walleriana. (Adaptado de [40])

## 2.3. Sistema nervoso - Tratamento

### 2.3.1. Sistema Nervoso Central

Atualmente, a maioria das terapias para tratamento de lesões do SNC é projetada para modificar farmacologicamente a resposta da LS, bloqueando um ou mais componentes da cascata neurocitotóxica ou para atenuar os sintomas da doença, mas não promove a restauração da rede neuronal dilacerada.[34,44,45] Depois disso, os pacientes entram num longo programa de reabilitação, durante o qual treinam os nervos remanescentes para compensar a perda causada pela lesão.

No entanto, o objetivo da comunidade científica é, não só minimizar a extensão da lesão, mas também promover a regeneração do tecido danificado. As estratégias que têm vindo a ser desenvolvidas para promover a regeneração do tecido nervoso incluem terapias à base de células ou de moléculas bioativas. A terapia celular visa promover a sobrevivência de células danificadas ou alterar o ambiente local para ser mais propício à regeneração, por exemplo, proporcionando suporte trófico. Infelizmente, a eficácia clínica desta técnica resulta em fraca sobrevivência celular, diferenciação descontrolada e integração ineficaz no tecido hospedeiro. [44]

A entrega de moléculas bioativas no SNC visa promover a regeneração tecidual. No entanto, a barreira hematoencefálica limita a difusão das moléculas, sendo necessário administrar doses muito elevadas para que a concentração necessária atinja o local alvo, o que muitas vezes leva a problemas de citotoxicidade, formação de fibrose ou de tumores. Para contornar a barreira hematoencefálica, é possível injetar as biomoléculas diretamente no local da lesão, mas existem riscos como edema cerebral e convulsões. [46]

Nos últimos anos, tem sido estudada a combinação de células ou moléculas bioativas com biomateriais. A ideia é implantar o biomaterial no local lesado, evitando a barreira hematoencefálica e os efeitos colaterais sistémicos, aumentando a sobrevivência e a integração das células fornecendo-lhes um substrato.

### 2.3.2. Sistema Nervoso Periférico

Atualmente, as técnicas cirúrgicas utilizadas para tratamento de LTNP são: sutura direta, enxertos nervosos (autoenxertos ou aloenxertos), transferências nervosas e tubos-guia.[40] A escolha da técnica adequada está maioritariamente relacionada com o comprimento do defeito do nervo. O algoritmo cirúrgico simplificado para reparação da LTNP encontra-se na Figura 12.

Quando o defeito é mínimo (< 1 cm), a sutura direta é o procedimento mais adequado pois é possível unir as duas extremidades lesadas de uma forma livre de tensão, fator essencial para que ocorra regeneração. [47–49]

Para lacunas entre 1 e 5 cm, o procedimento mais adotado é o autoenxerto de nervo, ou seja, é escolhida uma porção de nervo de outra parte do corpo do paciente para reparar o defeito. Esta técnica fornece uma fonte prontamente disponível de tecido específico do paciente, com um microambiente específico do nervo periférico e células de Schwann. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens já que a oferta de nervos doadores é limitada, há o sacrifício de um nervo funcional e é necessária uma segunda incisão para colher o enxerto, onde pode haver formação de cicatrizes e neuromas. [42,50]

Existem duas alternativas ao autoenxerto: o aloenxerto e os tubos-guia. O aloenxerto consiste em nervos retirados de cadáveres humanos o que oferece um suprimento ilimitado e deixa de ser necessário submeter o paciente a uma segunda cirurgia. Contudo, o risco de rejeição imunológica é elevado. [40,41] Nos últimos 20 anos, a ET tem vindo a desenvolver tubos-guia que, neste momento, permitem reparar falhas até 3 cm. Um tubo-guia consiste num tubo oco que é colocado ao redor do local da lesão e é capaz de direcionar os axónios que se desenvolvem da extremidade proximal para a distal, limitar a infiltração de tecido cicatricial e permitir a troca de nutrientes e outros produtos com o meio envolvente. [40,42] Idealmente, estes tubos têm propriedades biomecânicas e de superfície semelhantes às da MEC e podem ainda ser impregnados com agentes celulares, fatores neurotróficos, proteínas e peptídeos de modo a potenciar a regeneração do nervo. [41,42] Existem pelo menos três tipos de tubos bioabsorvíveis atualmente aprovados pela Food and Drug Administration (FDA): colagénio, ácido poliglicólico e caprolactona. [43]

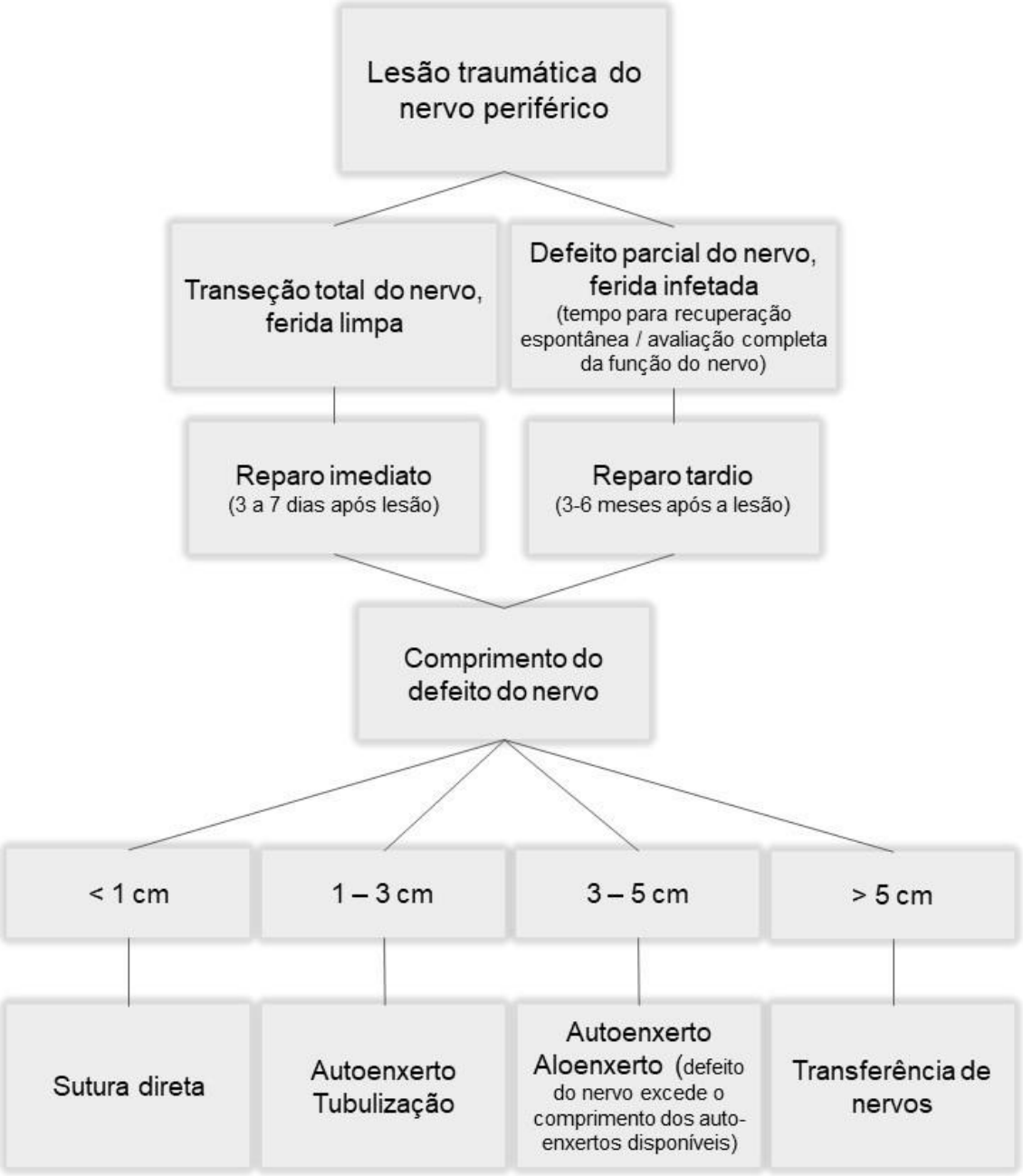



Figura 12 - Algoritmo cirúrgico simplificado para reparação do nervo periférico. [47,48]

## 2.4. Engenharia de Tecidos do Sistema Nervoso

A ET é uma área interdisciplinar que aplica conhecimentos da biologia, ciências dos materiais, física, química e medicina com o objetivo de restaurar, manter ou melhorar a função do tecido danificado a partir da combinação de células, moléculas bioativas, biomateriais e técnicas avançadas de microfabricação. [10,11]

A chave do sucesso das estratégias de ET é a construção de *scaffolds* a partir de biomateriais, que podem ter origem natural, sintética ou compósita. Dependendo da sua aplicação (por exemplo: regeneração da cartilagem, do nervo ou do osso), os *scaffolds* têm de possuir determinadas características físico-químicas, biomecânicas e biológicas para que sejam utilizados como substitutos viáveis. [12,51]

Relativamente à regeneração neural, a configuração do *scaffold* deve ser concebida de forma a facilitar a distribuição celular e o crescimento de novas estruturas neurais em 3D. Esta estrutura deve atuar como um substrato que replica as propriedades elétricas, químicas e mecânicas da MEC, de modo a promover a migração, adesão, proliferação e diferenciação das células neurais. [12]

Atualmente, os *scaffolds* para ET do SN incluem principalmente: hidrogéis, tubos, nanofibras e combinações destes (Figura 13).

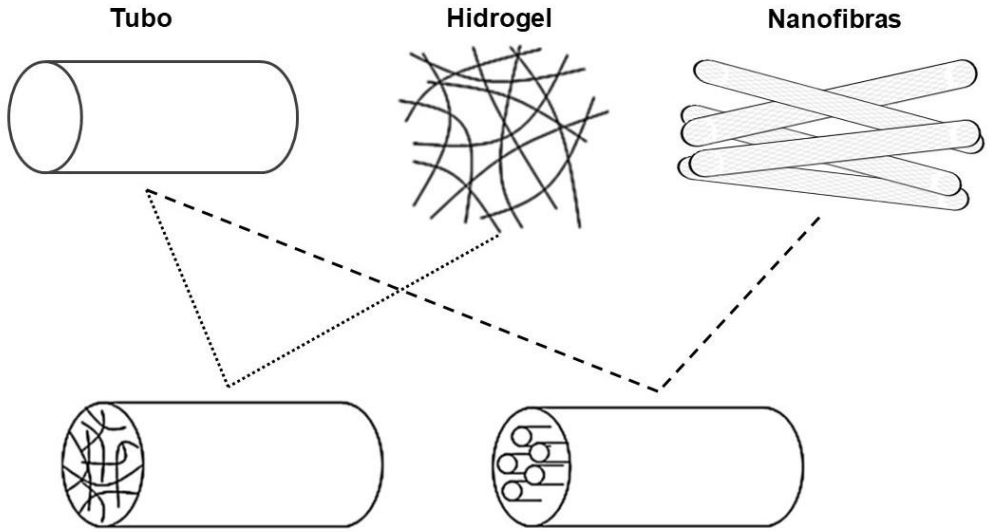



Figura 13 - Arquiteturas de *scaffolds* para engenharia de tecidos do sistema nervoso.

### 2.4.1. Biomateriais

No caso da ET do SN, os materiais a utilizar no fabrico de *scaffolds* devem ser macios o suficiente para não comprimir o tecido circundante, mas estruturalmente fortes para sustentar a fixação local. Devem ter boa biocompatibilidade, porosidade e permeabilidade adequadas, e nanotopografias de superfície para facilitar a condução, distribuição e crescimento celular. Por fim, devem possuir uma taxa de degradação semelhante à taxa de crescimento dos axónios e do tecido de suporte. [11]

Os biomateriais mais utilizados em *scaffolds* para o SN são derivados de polímeros naturais ou sintéticos. Alguns polímeros naturais, como a gelatina e o colagénio, para além de serem biocompatíveis e hidrofílicos, têm uma estrutura semelhante à da MEC, fornecendo orientação informativa inata. No entanto, apresentam como desvantagem a baixa resistência mecânica, a rápida taxa de degradação e a dificuldade em garantir a reprodutibilidade devido à variabilidade do material de origem. [13,52–54] Nos polímeros sintéticos é possível adaptar mais facilmente a arquitetura, a taxa de degradação e as propriedades mecânicas desses materiais de acordo com as aplicações, propriedades essas que são reprodutíveis de lote para lote. Apresentam como desvantagem a baixa bioatividade devido à falta de fatores de reconhecimento para as células. [13,52,53] De modo a superar os inconvenientes dos dois tipos polímeros, surgiram os materiais biossintéticos, ou compósitos, com propriedades mecânicas melhoradas em relação aos polímeros naturais e afinidade celular reforçada em relação aos sintéticos.[13]

Um dos polímeros que tem vindo a ser utilizado em *scaffolds* para ET do SN é o PCL. O PCL é um polímero sintético, não tóxico, biocompatível e biodegradável, com taxa de degradação relativamente lenta. O PCL é um poliéster de natureza elástica e, por isso, as suas características mecânicas são semelhantes às dos tecidos moles. Contudo, tem baixa afinidade celular devido à sua baixa hidrofilia e falta de grupos funcionais, o que resulta em baixa migração, adesão e proliferação celular.[55–58] De modo a melhorar a sua bioatividade, pode ser utilizado em combinação com outros polímeros naturais, como o colagénio, a gelatina ou o quitosano.

A gelatina é uma proteína fibrosa derivada da hidrólise parcial do colagénio, tem baixa imunogenicidade, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade e disponibilidade comercial a baixo custo. A gelatina contém resíduos de glicina, prolina e hidroxiprolina que favorecem a adesão e diferenciação celular.[53,57,59]

A maioria das nanofibras poliméricas não possui grupos funcionais específicos, sendo a sua única função o uso como *scaffold*, mas podem e devem ser especificamente funcionalizadas, por exemplo, com nanopartículas (NP), para aplicações de sucesso. Dependendo da sua composição, forma e tamanho, a incorporação de NP em nanofibras pode conferir-lhes ou melhorar certas propriedades, tais como, biocompatibilidade, área superficial, resistência mecânica, estabilidade química e propriedades elétricas. Podem ainda ser impregnadas com fármacos, fatores de crescimento e genes e funcionar como sistemas de libertação controlada. A incorporação de NP de prata em nanofibras de gelatina [60] ou de Poli(L-ácido lático)-co-poli(ϵ-caprolactona) [61] para a cicatrização de feridas e a combinação de NP de ouro com nanofibras de fibroína de seda em tubos-guia para regeneração do SNP [62] são alguns exemplos da funcionalização de nanofibras poliméricas com NP.

Recentemente, uma atenção crescente está voltada para a combinação de NP de carbono, como o grafeno e o GO, com polímeros. [53] O grafeno é uma das formas cristalinas do carbono e consiste numa folha de átomos densamente compactados com espessura de um átomo. Esta estrutura 2D apresenta uma banda eletrónica singular que lhe confere excelentes propriedades elétricas, térmicas e óticas. Adicionalmente, o grafeno exibe uma elevada área de superfície (≈ 2600 $m^2$ $g^{-1}$ [12]), que lhe confere excelentes propriedades de adsorção. O GO, o principal derivado de grafeno, apresenta uma capacidade ainda maior de adsorver moléculas como consequência da presença de grupos funcionais oxigenados que lhe conferem um caráter hidrofílico e possibilidade de estabelecer ligações químicas eletrostáticas e/ou covalentes com outras moléculas, permitindo maior dispersibilidade e menor tendência a formar agregados capazes de induzir respostas tóxicas em cenários biológicos.[12,15]

Existe ainda a possibilidade de reduzir o GO química ou termicamente, de forma controlada obtendo rGO. Relativamente ao GO, o rGO apresenta menor número de grupos funcionais de oxigénio ou mesmo a sua ausência,

dependendo do grau de redução, e zonas com a rede de carbonos restruturada, o que lhe confere alguma condutividade elétrica. Os *scaffolds* contendo rGO podem assim, ser eletricamente estimulados com o intuito de modular o comportamento das células neurais, incluindo a sua adesão, a sua proliferação, a sua migração e a sua diferenciação.[16–18]

### 2.4.2. Técnicas Avançadas de Microfabricação: Eletrofiação

O processo de usar forças eletrostáticas para formar fibras sintéticas é conhecido como eletrofiação. Esta técnica permite a produção de fibras a partir de soluções de polímeros naturais, sintéticos ou compósitos, com diâmetros que variam entre 3 nm e 5 µm.[63] A sua versatilidade e a configuração simples e de baixo custo tornam-na atrativa para muitas aplicações, tais como: membranas de filtração, sistemas catalíticos, aplicações elétricas e óticas, sensores, vestuário de proteção e *scaffolds* para engenharia de tecidos.[64]

A configuração típica de eletrofiação está ilustrada na Figura 14 e consiste numa fonte de alta voltagem, numa seringa com capilar e num coletor (placa estacionária, coletor rotativo, água, etc.) com ligação à terra. Através da ligação de um elétrodo da fonte de alta tensão ao capilar metálico da agulha, a solução polimérica é submetida a um campo elétrico. Quando as forças eletrostáticas equilibram a tensão superficial do líquido forma-se o cone de Taylor e, quando as superam, um jato de fibra é ejetado e acelerado em direção ao coletor. O jato eletricamente carregado passa então por uma instabilidade de flexão, passando por um processo de *whipping* aumentando assim o comprimento do caminho até ao coletor e contribuindo para o alongamento e adelgaçamento da fibra, enquanto facilita a evaporação do solvente. [65,66]

Apesar da relativa facilidade de uso da eletrofiação, existem vários parâmetros que podem afetar significativamente a formação e a estrutura das fibras. Esses parâmetros podem ser divididos em [63]:

- Propriedades da solução: viscosidade, condutividade, tensão superficial, peso molecular do polímero, momento dipolo e constante dielétrica;

- Variáveis controladas: caudal, intensidade do campo elétrico, distância entre o capilar e o coletor, geometria do capilar, composição e a geometria do coletor;
- Parâmetros ambientais: temperatura, humidade e velocidade do ar.

A influência da variação de alguns parâmetros na morfologia da fibra está listada na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeitos de parâmetros de eletrofiação na morfologia da fibra. [66] Nota: (↑) significa aumento; ↓ significa decréscimo.

| **Parâmetro** | **Efeito na morfologia da fibra** |
|---|---|
| Voltagem ↑ | Diâmetro da fibra ↓ inicialmente, e depois ↑ |
| Caudal ↑ | Diâmetro da fibra ↑ |
| Distância entre o capilar e o coletor ↑ | Diâmetro da fibra ↓ |
| Condutividade da solução ↑ | Diâmetro da fibra ↓ |

Nos últimos anos, a eletrofiação surgiu como uma técnica popular em ET, já que possibilita a produção de estruturas fibrosas com elevada porosidade e uma razão área superficial/volume capazes de mimetizar a MEC, transportar medicamentos para terapia química e intensificar a adesão das células ao *scaffold* (Figura 15).[67]

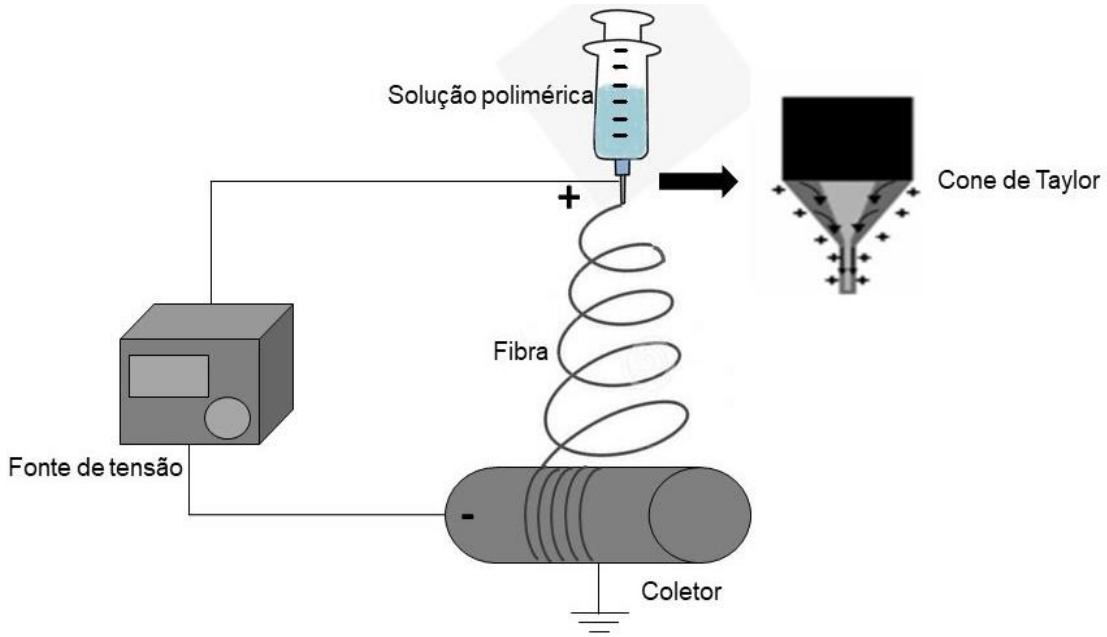



Figura 14 - Esquema de um sistema de eletrofiação com coletor rotativo.

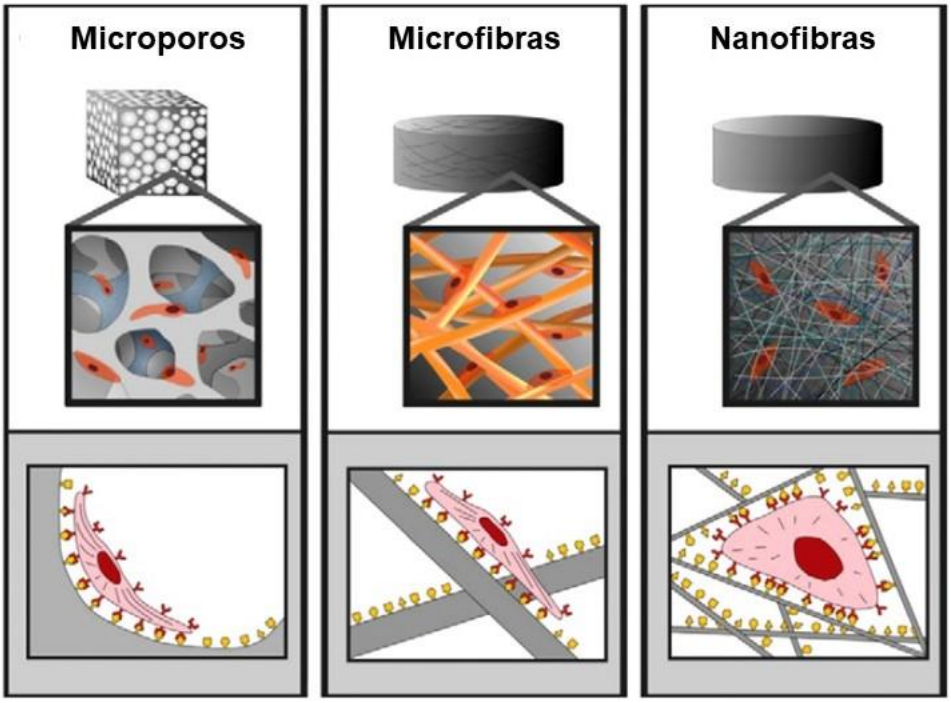



Figura 15 - Influência da arquitetura do *scaffold* na adesão e proliferação celular. [67]

### 2.4.3. *Scaffolds* para Engenharia do Sistema Nervoso: Estado da Arte

Como já foi referido, o PCL pode ser combinado com outros polímeros, como a gelatina, de modo a aperfeiçoar a sua bioatividade. Por exemplo, Gupta et al.[57] fabricaram um *scaffold* compósito de PCL-gelatina, por eletrofiação, e compararam-no a um *scaffold* de PCL puro quanto à hidrofilia, grupos funcionais e crescimento de células de Schwann. Os autores verificaram que as fibras de PCL eram hidrofóbicas, apresentando um ângulo de contacto de 112°, enquanto que as fibras compósitas eram altamente hidrofílicas, com um ângulo de contacto de 0°, significando a presença de grupos hidrofílicos na superfície do *scaffold*. Ao nono dia de cultura, os *scaffolds* de PCL continham células de Schwann com uma morfologia anómala, arredondada e plana, enquanto que nos *scaffolds* de PCL-gelatina a morfologia era normal (Figura 16). Além disso, a proliferação nas nanofibras de PCL-gelatina era 80% superior à encontrada nas de PCL. Foi, então, possível inferir que a gelatina favoreceu o crescimento e a morfologia normal das células de Schwann.

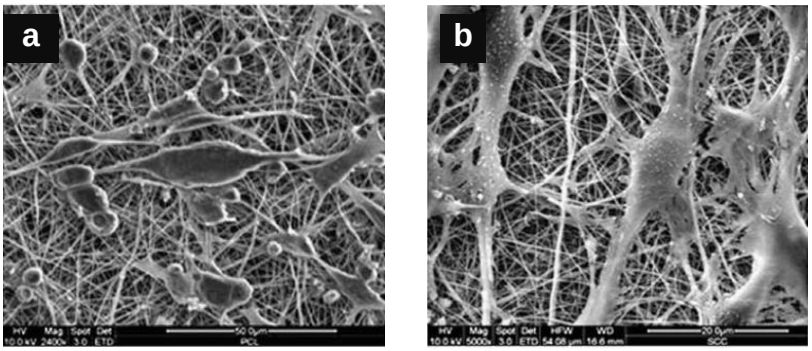



Figura 16 - Micrografias SEM de células Schwann em *scaffolds* nanofibrosos obtidas no nono dia de cultura celular: (a) nanofibras de PCL; (b) nanofibras de PCL-gelatina. (Adaptado de [57])

Num outro exemplo, Shah et al.[68], fabricaram *scaffolds* nanofibrosos para orientar a diferenciação de células-tronco neurais em oligodendrócitos. Para isso, foram produzidas fibras de PCL obtidas por eletrofiação, que foram posteriormente depositadas sobre um substrato de vidro e, sobre elas, foi aplicada uma fina camada de GO. Após seis dias de cultura, foi observada uma diferença significativa na morfologia das células presentes nas nanofibras revestidas com GO, em comparação com as nanofibras de PCL. As células depositadas nas fibras revestidas apresentaram uma ampla ramificação dos processos celulares evidenciando que os *scaffolds* híbridos favorecem a diferenciação das células-tronco em oligodendrócitos, como está demonstrado na Figura 17.

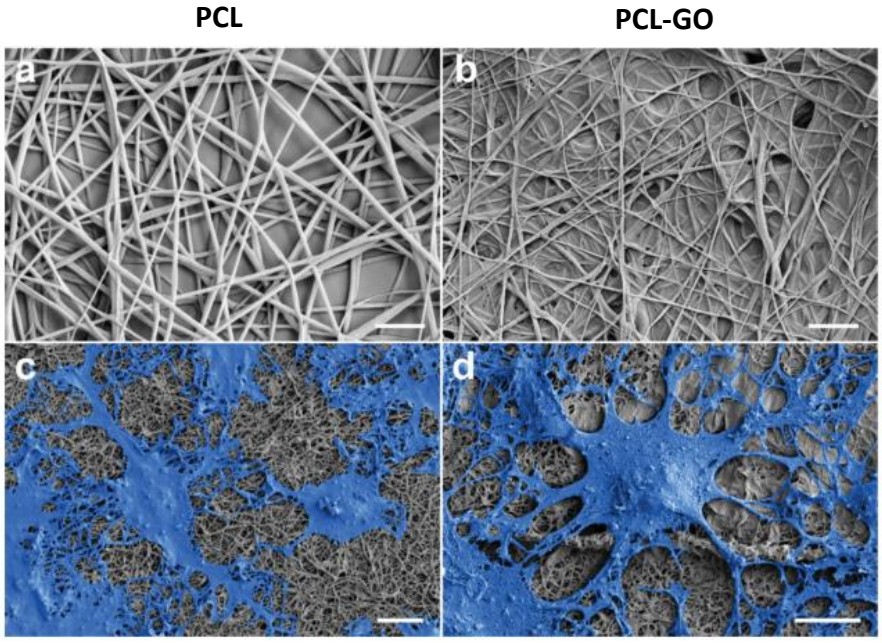



Figura 17 – Imagens SEM de (a) nanofibras de PCL (b) e nanofibras de PCL revestidas com GO (1.0 mg/mL). Escala: 2 µm. Imagens SEM de (c) células tronco neurais diferenciadas em nanofibras de PCL e (d) nanofibras híbridas após seis dias de cultura. Escala 10 µm. [68]

Para testar o efeito do GO no reforço das propriedades mecânicas do PCL, Wan e Chen[69] fabricaram nanofibras de PCL-GO (0,3 wt% de GO) e, ao compará-las com nanofibras de PCL, verificaram que, apesar de um ligeiro aumento na porosidade, a presença de GO aumentou a tensão de rotura (TR) e o módulo de Young (E) das nanofibras em 95% e 66% respetivamente. Além disso, experiências de biomineralização em fluido fisiológico simulado mostraram que o GO facilitou a nucleação de fosfatos de cálcio nas fibras de PCL graças aos seus grupos funcionais aniónicos.

Scaffaro et al.[70] estudaram o efeito da adição de diferentes concentrações de GO em *scaffolds* eletrofiados de PCL. As nanofibras, orientadas aleatoriamente, apresentaram uma morfologia suave e regular, exceto para concentrações mais altas (1 wt% GO), onde eram visíveis algumas nanofolhas de GO que causaram irregularidades. Os autores esperavam que a adição de GO, por este ter uma superfície rica em grupos oxigenados, tornaria o PCL mais hidrofílico, o que se verificou, mas de forma pouco acentuada, o ângulo de contacto diminuiu de 118,3° (PCL) para 105,5° nas fibras com maior quantidade de GO. O E aumentou cerca de 7 MPa com o aumento da concentração até 0,75% em peso das NC e depois diminuiu [Figura 18 a)]. Pensa-se que isto ocorreu porque, a maiores concentrações, as NC tendem a agregar-se. Os valores de TR [Figura 18 b)] sofreram um incremento com 0,25% em peso de GO, seguindo-se uma diminuição. Por fim, a elongação máxima ($\varepsilon_m$) registou o maior valor para o PCL puro (200 %) e foi diminuindo à medida que a concentração de GO ia aumentando como está patente na Figura 18 c). Os autores consideraram que as nanofibras com melhor performance mecânica são as que contêm 0,25 wt% de GO.

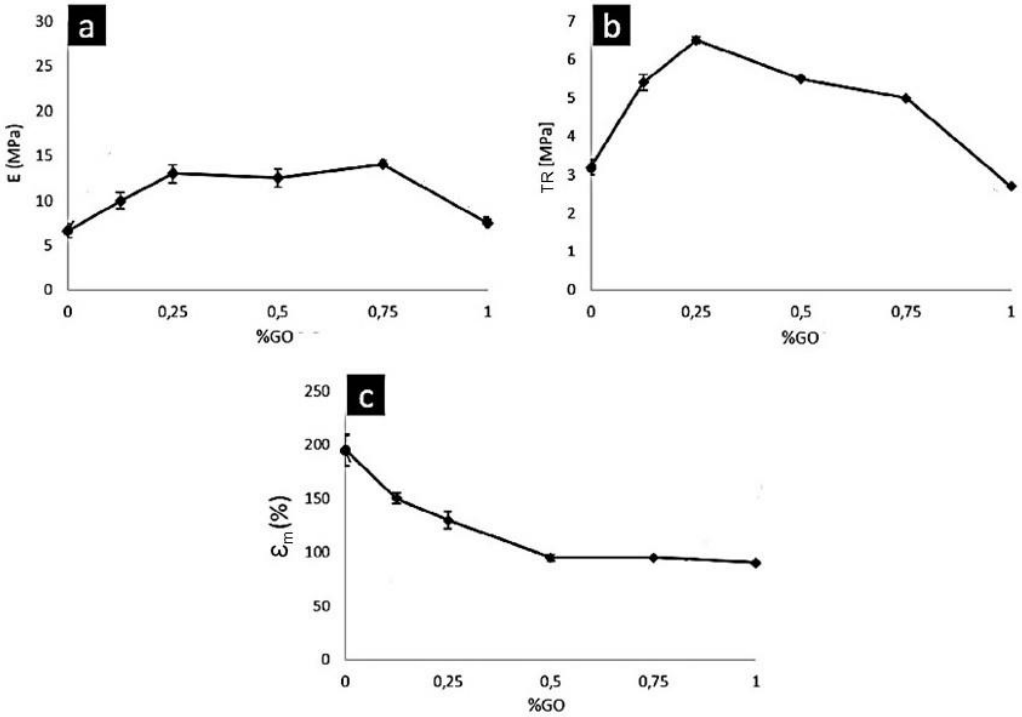



Figura 18 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$ dos *scaffolds* nanofibrosos de PCL-GO. [70]

Lopresti et al.[71] fizeram um estudo semelhante, mas adicionaram ao PCL percentagens de 0,5, 1 e 2 % em peso de GO. O E aumentou gradualmente com o aumento da concentração de GO [Figura 19 a)]. A TR aumentou para concentrações de 0,5 wt% e depois diminuiu [Figura 19 b)], provavelmente porque o material se tornou mais frágil com a adição continuada de GO, o que foi confirmado pela diminuição progressiva da $\varepsilon_m$ [Figura 19 c)]. Quando a concentração de GO foi aumentada para 2% em peso, a TR diminuiu drasticamente, tornando-se ainda mais baixa do que a do PCL puro. O aumento das propriedades mecânicas em baixa concentração de GO pode ser atribuído à dispersão uniforme das nanofolhas na matriz polimérica. No entanto, quando a adição de GO passa um certo limite, as NC provavelmente tendem a agregar-se, resultando na redução da TR e da $\varepsilon_m$, sem incremento do E.

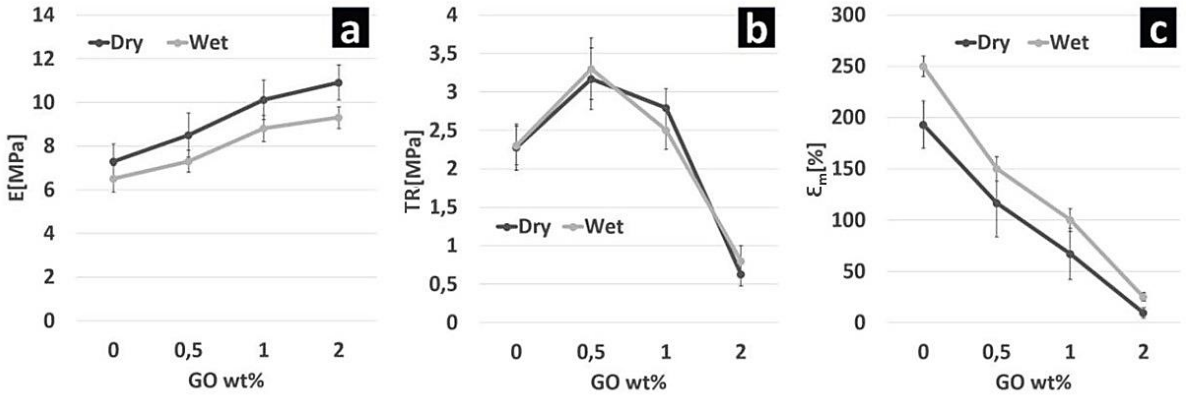



Figura 19 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$ em função do peso de GO. [71]

Nagarajan et al.[72] estudaram o efeito da incorporação de GO em fibras de gelatina nas propriedades mecânicas e químicas e na adesão e proliferação celular. Para isso, produziram nanocompósitos de gelatina e GO por eletrofiação, que posteriormente foram estabilizados com glutaraldeído. Os investigadores verificaram que as propriedades mecânicas se foram aprimorando à medida que a incorporação de GO aumentava, como é possível observar na Tabela 4. A análise química do compósito revelou que o reforço mecânico se deve às ligações de hidrogénio entre carboxilatos, grupos alcóxido e grupos hidroxilo do GO e da amida A da gelatina. Estes autores avaliaram a biocompatibilidade da gelatina e gelatina-GO, a adesão e proliferação celular e a citotoxicidade. Para tal foram realizadas culturas celulares durante 8 dias utilizando linhas celulares de osteossarcoma. A adesão das células foi detetada após 24 horas em todas as amostras e uma proliferação significativa foi observada após 4 e 8 dias. A adesão e proliferação nos compósitos com concentrações de GO distintas não pareceram significativamente diferentes em comparação com a malha de gelatina pura, o que sugere que a adição de GO à gelatina não afeta a biocompatibilidade dos *scaffolds*. O mesmo se verificou no teste de citotoxicidade, representado na Figura 20.

Tabela 4 - E, TR e $\varepsilon_m$ de nanofibras de gelatina com diferentes quantidades de GO. [72]

| wt% | Módulo de Young (GPa) | Tensão de Rotura (MPa) | Elongação máxima (%) |
|---|---|---|---|
| **0GO** | 1,70 ± 0,16 | 2,82 ± 0,16 | 0,73 ± 0,13 |
| **0.01GO** | 1,80 ± 0,19 | 4,06 ± 0,32 | 0,72 ± 0,02 |
| **0.1GO** | 2,30 ± 0,41 | 4,01 ± 0,13 | 1,31 ± 0,22 |
| **1GO** | 2,90 ± 0,01 | 8,67 ± 0,58 | 6,26 ± 0,13 |

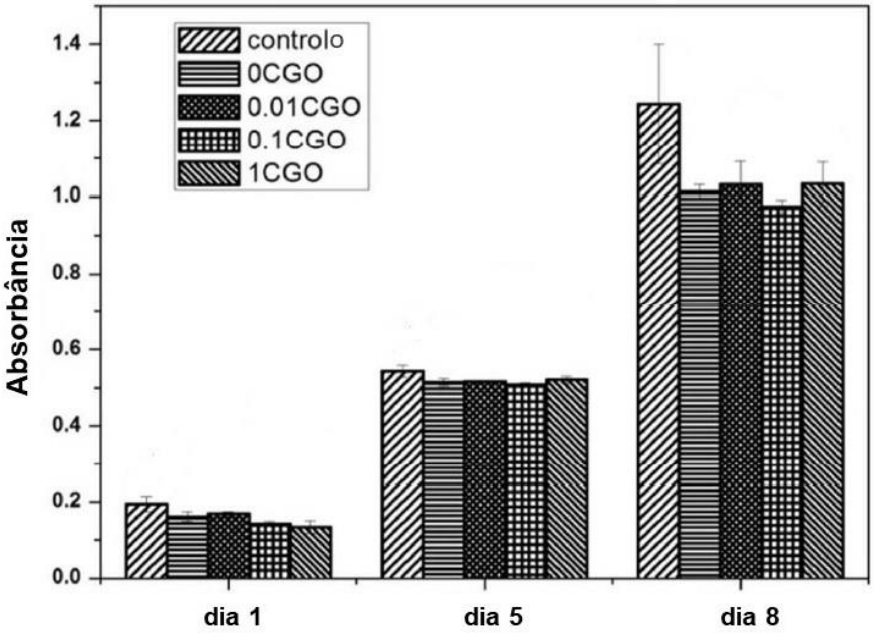



Figura 20 - Citotoxicidade dos *scaffolds* nanofibrosos. [72]

Jalaja et al.[73] realizaram um trabalho semelhante ao anterior, tendo produzido nanofibras de gelatina-GO mas, neste caso, as nanofibras foram estabilizadas com dextrano-aldeído (DA), obtendo-se resultados bastante diferentes no que diz respeito às propriedades mecânicas. Analisando a Figura 21 a), constata-se que houve um aumento da TR até à concentração de 0,5 wt% e, posteriormente, uma diminuição para as concentrações mais elevadas. Já o E é maior nas nanofibras de gelatina puras e menor nas nanofibras com 0,5 wt% [Figura 21 b)].

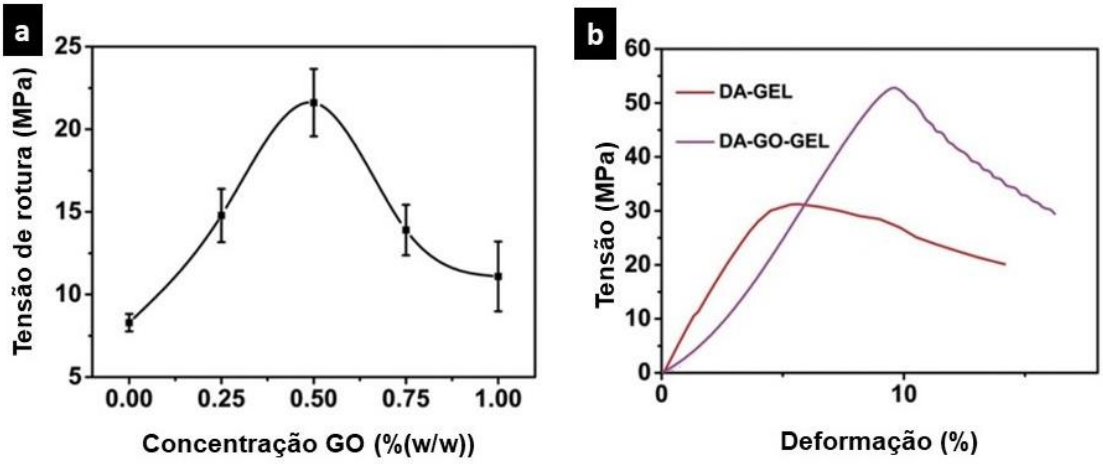



Figura 21 - (a) TR em função da concentração de GO. (b) Curvas tensão-deformação das mantas de DA-GEL e DA-GO-GEL (0.5% (w/w). [73]

Heidari et al.[53] foram mais além na complexidade da composição das fibras e fabricaram mantas fibrosas de PCL-gelatina-grafeno com concentrações de grafeno de 0, 1, 1,5 e 2 wt%. A adição de grafeno até 1,5 wt% resultou num aumento substancial no E e na TR e numa diminuição da $\varepsilon_m$ (Figura 22). Os autores sugerem que, por um lado, o aumento da resistência mecânica pode ser atribuído às ligações de hidrogénio e às interações $CH_2$-π entre as cadeias de PCL e as NC. Por outro lado, a gelatina pode atuar como um agente para a funcionalização do grafeno, ou seja, podem ocorrer interações entre o grafeno e grupos funcionais da gelatina, atuando como uma ponte para a fixação do PCL e do grafeno. Já a diminuição da $\varepsilon_m$ pode dever-se ao movimento restrito das cadeias poliméricas devido a interações entre o grafeno e a matriz polimérica. Em contrapartida, a incorporação de 2% em peso de grafeno na estrutura nanofibrosa, resultou na diminuição da TR e do E e no aumento da $\varepsilon_m$. Pensa-se que para concentrações mais elevadas de grafeno, exista um aumento das forças de *Van der Waals* entre as nanofolhas que tendem a agregar, o que provoca a redução das propriedades mecânicas. Estes autores estudaram ainda as caraterísticas elétricas das nanofibras através da medição da impedância. Os valores de impedância reduziram progressivamente com o aumento da concentração de grafeno e estão listados na Tabela 5. No entanto, o procedimento utilizado não é claro e os valores obtidos levantam algumas dúvidas por serem demasiado baixos. Posteriormente calcularam a condutividade através da fórmula:

$$\sigma = \frac{L}{R \times A}$$

onde L é a espessura, R é a resistência e A é a área da superfície da amostra. Por fim, cultivaram células PC12 em duas amostras, PCL-gelatina e PCL-gelatina-grafeno, e concluíram que, até ao quinto dia, a viabilidade celular aumentou sendo superior nas nanofibras incorporadas com NC (Figura 23). Seguiu-se uma diminuição da viabilidade até ao sétimo dia, altura em que as duas amostras apresentaram valores semelhantes.

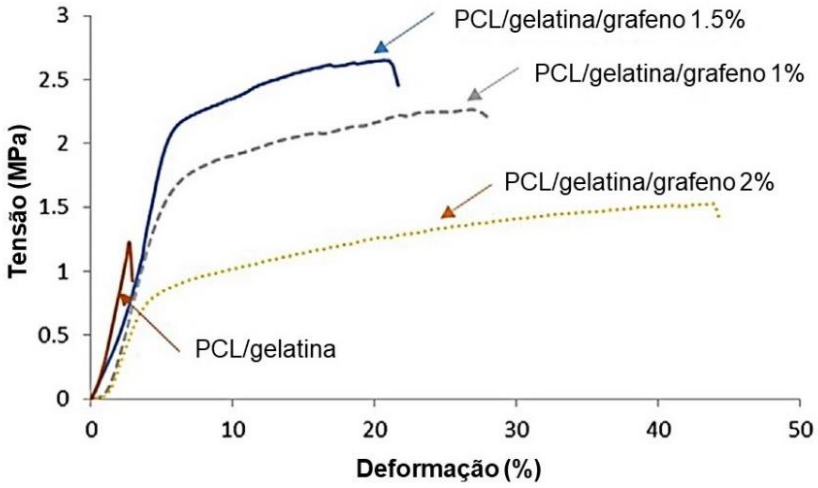



Figura 22 - Curvas tensão-deformação de amostras de PCL/gelatina, PCL/gelatina/grafeno 1%, PCL/gelatina/grafeno 1,5% e PCL/gelatina/grafeno 2%.[53]

Tabela 5 - Valores de impedância e condutividade de nanofibras com diferentes percentagens de grafeno.[53]

| Amostra | Espessura (µm) | Impedância (Ω) | Condutividade (µs/cm) |
|---|---|---|---|
| **PCL-gelatina** | 60 | 2000 | 3,7 |
| **PCL-gelatina-grafeno 1%** | 90 | 600 | 18,5 |
| **PCL-gelatina-grafeno 1.,5%** | 100 | 330 | 41,1 |
| **PCL-gelatina-grafeno 2%** | 90 | 215 | 51,6 |

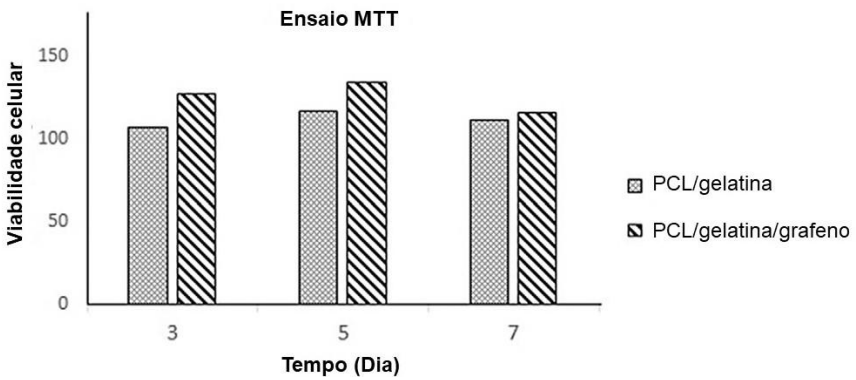



Figura 23 - Resultados de MTT de células PC12 em nanofibras de PCL-gelatina e PCL-gelatina-grafeno após 3, 5 e 7 dias de cultura celular. [53]

Com o intuito de estudar o efeito da estimulação elétrica no comportamento das células neurais, Sherrell e a sua equipa [74] semearam células PC-12 num filme de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) revestido com uma camada de grafeno (por drop-casting). Estimularam o substrato eletricamente durante 8h por dia, ao longo de 3 dias, com uma corrente constante e verificaram que ocorreu um grande aumento no comprimento e na conectividade das neurites [Figura 24 b)] em comparação com células não estimuladas [Figura 24 a)]. Analisando o gráfico da Figura 25 a) constata-se que o comprimento médio das neurites aumentou cerca de 2,5 vezes por célula e, no histograma ao lado [Figura 25 b)], vê-se que houve um aumento no número de neurites mais longas (maior que 100 μm) em substratos estimulados. Este aumento do comprimento e da conectividade das neurites mostra que a estimulação elétrica aumentou o grau de diferenciação das PC-12.

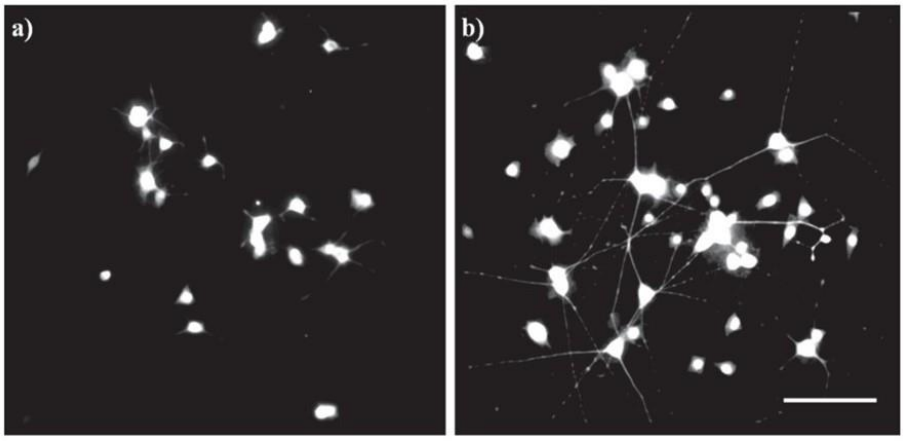



Figura 24 –Imagens de microscopia de fluorescência de células PC-12 em grafeno sem (a) e com (b) estimulação elétrica. Escala 50μm. [74]

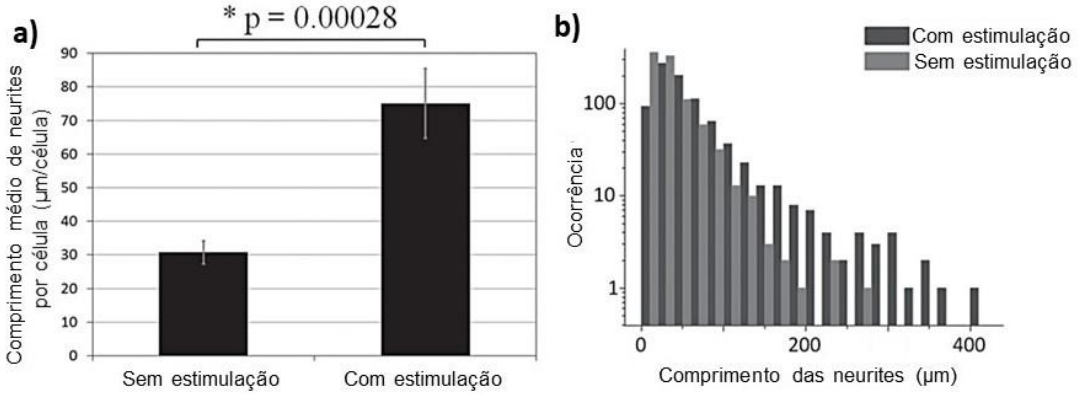



Figura 25 - a) Comprimento das neurites obtido através da análise de imagens numa área de 8 $mm^2$. b) Histograma que compara a frequência de ocorrência de comprimentos de neurites nas populações estimuladas e não estimuladas. [74]

Num outro estudo, Li et al.[17], demonstraram que células tronco neurais adsorvidas em *scaffolds* de grafeno, onde foi aplicado um estímulo elétrico, mostraram um aumento de 50 a 60% na concentração intracelular de iões cálcio, comparativamente a *scaffolds* não estimulados.

Por fim, Ramazani e Karimi [75] estudaram o efeito da incorporação de GO e rGO nas propriedades mecânicas de matrizes poliméricas de PCL. Analisando os gráficos da Figura 26 a) e b), é possível observar que a incorporação das NC aumentou a TR de forma notável para concentrações de 0.1 wt%, contudo, seguiu-se uma diminuição progressiva para concentrações mais elevadas. No que diz respeito ao E [Figura 26 c)], verificou-se um aumento para concentrações de 0.1% em peso, os valores mantiveram-se estáveis até 0.5 wt% e seguiu-se uma diminuição quando a concentração das NC atingiu 1 wt%. É importante salientar que os valores de TR e E das fibras compostas por PCL-rGO foram sempre superiores ao das compostas por PCL-GO para a mesma concentração de NC. Os autores concluíram que, em termos de propriedades mecânicas, a concentração crítica de GO e rGO em PCL é 0.1 wt%, visto que com concentrações mais altas, a distância entre nanofolhas torna-se tão pequena que elas tendem a agregar-se devido às forças de *Van der Waals*, o que dificulta a dispersão uniforme e a transferência de carga.

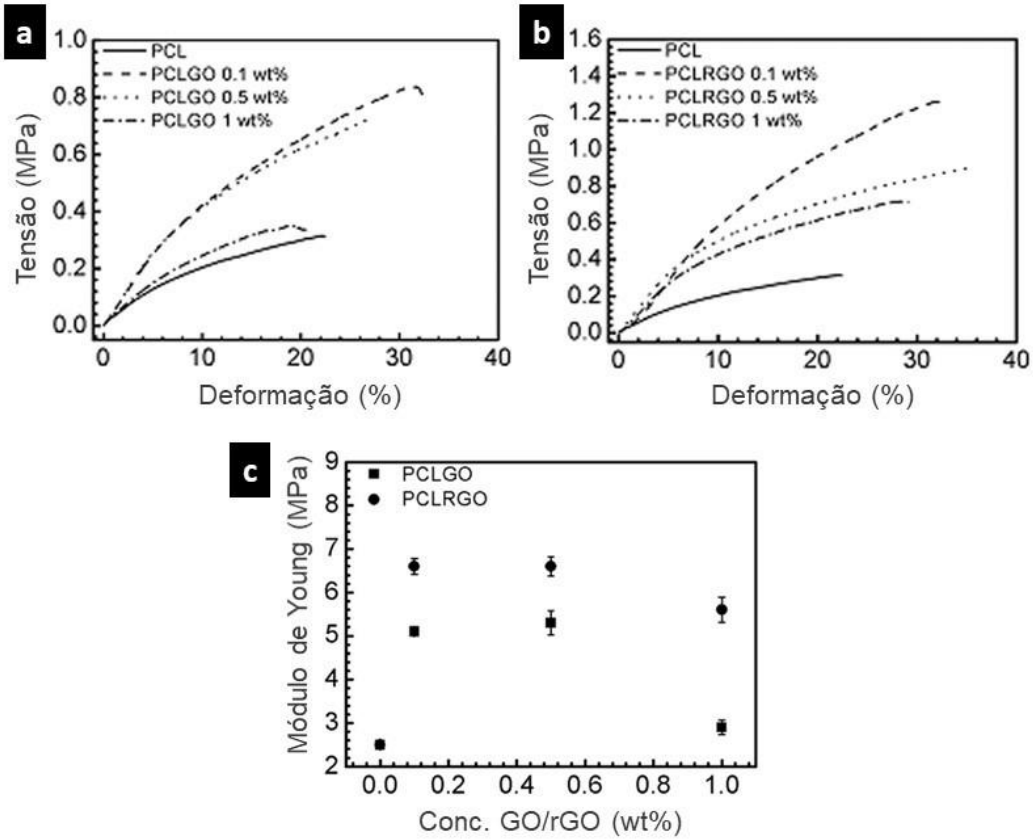



Figura 26 – (a) e (b) curvas tensão-deformação e (c) E de nanofibras de PCL-GO e PCL-rGO contendo diferentes quantidades de GO e RGO. [75]

# 3. Materiais e Métodos

O ponto de partida do trabalho descrito nesta tese foi o fabrico de um scaffold fibroso de PCL-gelatina cuja percentagem relativa dos dois componentes e as condições de eletrofiação estavam já otimizadas pelo grupo de investigação TEMA. Seguiu-se depois a incorporação de NC na matriz polimérica.

## 3.1. Materiais

De modo a reduzir as folhas de GO (4 mg/mL, suspensão aquosa: Graphenea) a um tamanho ideal para a incorporação nas nanofibras de PCL-gelatina optou-se por realizar um processo que combina ultrasonicação e agitação mecânica.[76] Este processo, para além de promover a quebra das forças de *Van der Waals* entre as camadas de GO conduzindo a um melhor grau de esfoliação das folhas promove igualmente a quebra dessas mesmas folhas diminuindo o seu tamanho lateral, sendo este o objetivo principal deste procedimento. Para isso, colocaram-se 40 mL da suspensão de GO em ultrassons com uma ponta cilíndrica durante 90 minutos, com pulsos de 30 segundos e 30 segundos de intervalo. Durante o processo, à medida que a suspensão ia evaporando, foi-se acrescentando uma solução de $H_2O$:Ácido Acético (AA) (100:1 vol), com pH semelhante ao da suspensão de GO, de modo a manter constante o volume inicial e consequentemente a concentração de GO. As folhas de GO que passaram por este processo serão designadas por nano GO (nGO). Contudo, optou-se também por produzir nanofibras incorporadas com GO no seu tamanho original, de modo a analisar de que forma o tamanho das NC influencia as propriedades morfológicas, mecânicas e químicas, assim como a biocompatibilidade dos *scaffolds*.

Para reduzir as suspensões de GO e nGO (rGO e nrGO), misturaram-se 30 mL de cada suspensão com 30 µL de hidrazina sob agitação.

## 3.2. Fabrico dos *Scaffolds*

### 3.2.1. Soluções Compósitas

Para preparar uma solução de 10% m/v PCL:gelatina (1:1 m/m) em 2,2,2,-trifluoroetanol (TFE) começou-se por preparar soluções de PCL (80 kDa: Sigma-Aldrich) e gelatina (Sigma-Aldrich) em TFE (Alfa Aesar) (10% m/v), separadamente. Cada um dos polímeros foi adicionado ao TFE e ficaram a agitar durante a noite.

Suspensões de GO, nGO, rGO e nrGO com várias concentrações foram preparadas centrifugando as suspensões precursoras durante 30 minutos a 12000 rpm. De seguida, removeu-se o sobrenadante e encheu-se com diferentes volumes de AA. As novas suspensões foram deixadas a agitar durante a noite.

No dia seguinte, juntou-se a gelatina ao PCL. No caso do compósito de PCL-gelatina, adicionou-se também 0,2% de AA relativamente ao volume de TFE, nos restantes compósitos adicionaram-se as NC em AA, deixando-se a agitar durante 1h 30m (Figura 27). Ao todo, foram preparadas dezassete suspensões distintas (Tabela 6).

Tabela 6 - Suspensões de PCL-gelatina-NC

| | **Materiais** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | PCL:gel | PCL:gel:GO | PCL:gel:nGO | PCL:gel:rGO | PCL:gel:nrGO |
| **% de NC em peso de PCL:Gel** | 0 | 0,15<br>0,3<br>0,6<br>1,0 | 0,15<br>0,3<br>0,6<br>1,0 | 0,15<br>0,3<br>0,6<br>1,0 | 0,15<br>0,3<br>0,6<br>1,0 |

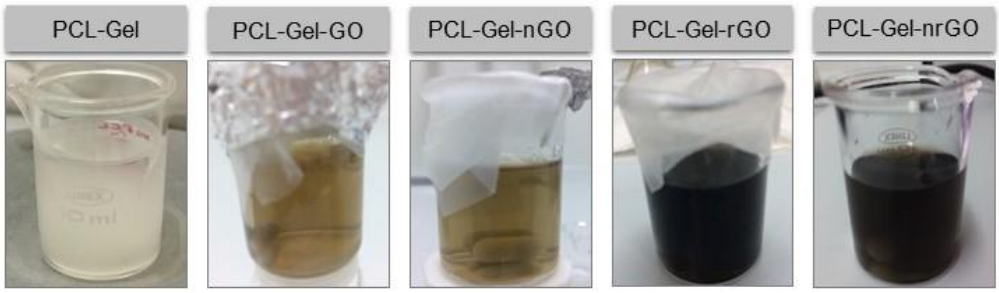



Figura 27 - Suspensão controlo e suspensões com 0.6 wt% de GO, nGO, rGO e nrGO.

### 3.2.2. Eletrofiação

Um procedimento convencional de eletrofiação foi adotado para fabricar nanofibras PCL-gelatina e compósitos de PCL-gelatina com diferentes tipos de NC. As suspensões, em seringas de plástico, foram colocadas cuidadosamente no equipamento de eletrofiação (NANON-01A, MECC Co. Ltd.) e um coletor rotativo foi envolvido com folha de alumínio. As nanofibras foram eletrofiadas com um caudal de 1 mL/h, foi aplicada uma voltagem entre 27 e 29 kV, a distância entre a agulha e o coletor foi de 13 cm, a distância percorrida pela agulha foi de 30 cm a uma velocidade, na direção horizontal, de 5 mm/s.

## 3.3. Caracterização

### 3.3.1. Análise Morfológica

O tamanho das NC foi medido usando um analisador Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK), e foi calculado a partir da média de quatro medidas. [76]

O diâmetro, alinhamento e topografia das nanofibras foram analisados através de fotografias tiradas com microscópio eletrônico de varrimento (SEM, do inglês *scanning electron microscope*) (Hitachi SU 70; Hitachi High-Technologies Corporation, Krefeld, FR, Alemanha). As amostras foram fixadas com fita de carbono no suporte específico para SEM e foram revestidas por pulverização catódica com ouro. Os diâmetros médios das nanofibras foram calculados a partir de 100 medidas, usando as imagens SEM e o software *ImageJ*.

### 3.3.2. Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos de tração (Figura 28) foram realizados no equipamento Shimadzu MMT-101N (Shimadzu Scientific Instruments, Quioto, Japão) e foi utilizada uma taxa de alongamento de 1 mm/min. As malhas fibrosas foram cortadas em retângulos com dimensões de 15 mm × 5 mm (comprimento × largura) e foram testadas cinco amostras de cada condição. Para cada amostra foi medida a respetiva espessura com um micrómetro.

Os E das amostras foram calculados a partir da região linear das curvas tensão-deformação, a TR foi considerada como o ponto mais elevado no eixo das ordenadas e a $\varepsilon_m$ foi considerada o maior ponto do eixo das abcissas antes de se dar a rotura.

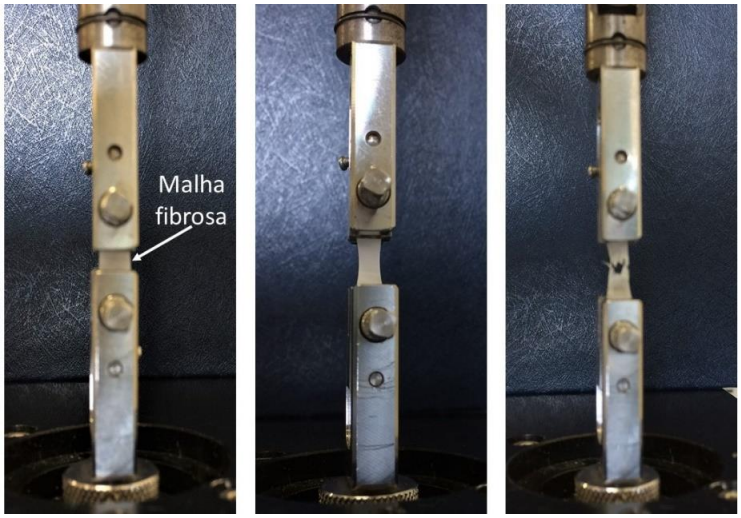



Figura 28 - Ensaio de tração no equipamento Shimadzu MMT-101N numa amostra do compósito PCL-gelatina-nrGO (1.0 wt%).

### 3.3.3. Análise Química

A estrutura química dos *scaffolds* foi analisada por espetroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com modo de refletância total atenuada (ATR-FTIR, do inglês *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) num espectrómetro Bruker Tensor 27 FT-IR (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA). Os espetros foram registrados entre 4000 e 500 $cm^{-1}$, com resolução de 4 $cm^{-1}$ e 64 varreduras.

Os grupos funcionais presentes nas mantas foram analisados utilizando o Espectrómetro Bruker RFS 100/S FT-Raman, que possui uma resolução de 1 $cm^{-1}$.

### 3.3.4. Molhabilidade

A hidrofilicidade é um requisito chave para a incorporação de nanofibras em engenharia de tecidos. Nanofibras hidrofílicas aumentam a adesão e proliferação celular em comparação com nanofibras hidrofóbicas que não possuem locais de superfície adequados para interagir com as células.

Assim, a molhabilidade das nanofibras foi estudada com recurso ao equipamento Kino DAS model SL200HT. Uma gota de água destilada foi libertada na superfície das malhas, várias imagens tiradas e o ângulo de contacto foi calculado através de 5 medições no software *ImageJ* em quatro instantes distintos: 0, 2, 5 e 10 segundos.

## 3.4. Biocompatibilidade

### 3.4.1. Cultura Celular

Para a cultura celular, começou-se por cortar quatro réplicas de cada malha com um vazador circular de 13 mm. Depois esterilizaram-se as amostras (Figura 29) seguindo o protocolo especificado no Anexo 1. Por fim, as amostras foram embebidas com meio de cultura, 10% FBS MEM:F12 (1:1), durante alguns minutos para promover a fixação celular.

Após esse processo, os *scaffolds* estavam prontos para a cultura celular. As células escolhidas foram células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC CRL-2266), derivadas da linha celular SK-N-SH, estabelecida a partir de um neuroblastoma humano.[77] Estas células são mantidas em meio MEM (do inglês, Minimal Essential Medium):F12 (1:1) (Gibco) contendo 10% FBS (do inglês fetal bovine serum), 2 mM L-glutamina e 1% mistura de antibióticos/antimicóticos (Gibco), numa incubadora a 37ºC e 5% $CO_2$.

Para plaquear um número definido de células vivas, foi utilizado um ensaio de exclusão de corante, em que as células vivas com uma membrana citoplasmática intacta excluem o reagente, enquanto as células mortas coram de azul devido à incorporação de corante através das membranas citoplasmáticas danificadas. A 100 µL da suspensão inicial de células, foram adicionados 10 µL de *Trypan Blue*. Colocou-se ~10 µL da suspensão numa câmara de Neubauer, fez-se a contagem das células não coradas (viáveis) e depois calculou-se a concentração celular para posterior cultura celular.

Um volume com 12000 células foi plaqueado em cada poço, diretamente em cima dos *scaffolds*, e foi adicionado meio fresco até perfazer 500 µL. Os *scaffolds* foram mantidos em cultura durante sete dias, nas mesmas condições em que se faz a manutenção da cultura celular, e o meio foi renovado a cada

dois dias. Foram utilizados controlos positivos (apenas células) e negativos (apenas *scaffolds*).

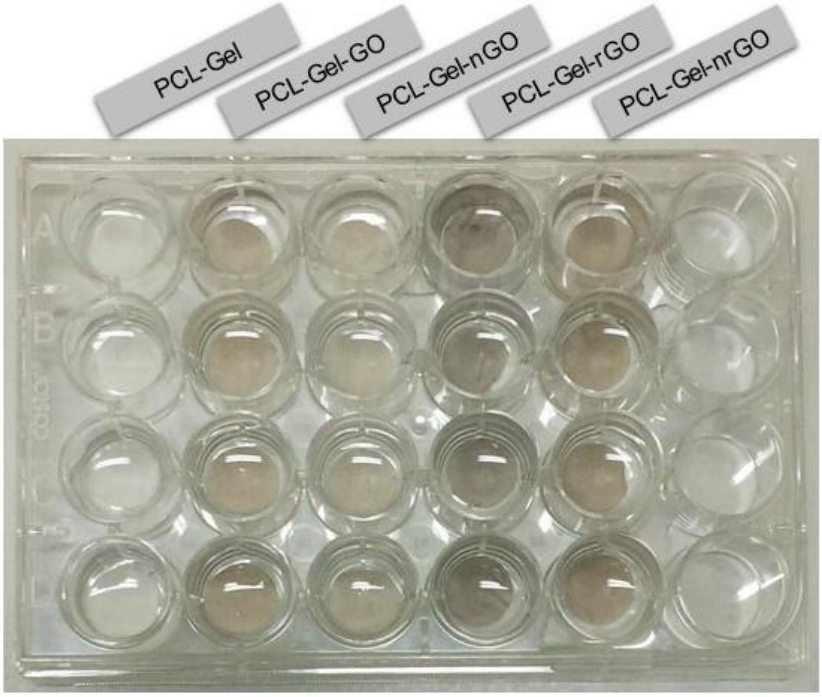



Figura 29 - Amostras esterilizadas prontas para cultura celular.

### 3.4.2. Viabilidade Celular

A atividade metabólica foi avaliada nos dias 1, 2, 4 e 7, através de ensaios de resazurina. A resazurina é um corante azul que é internalizado pelas células e metabolicamente reduzido a resorufina, resultando em mudanças de cor e fluorescência mediante a atividade metabólica celular.[78] Para concretizar a medição da atividade metabólica das células, substituiu-se o meio de cultura por meio com 10% de uma solução de resazurina (0,1 $mg.mL^{-1}$ em PBS), seguindo-se um período de incubação de cerca de 4 horas a 37ºC. Após esse período, transferiram-se 200 µL de meio de cada poço para uma placa de 96 poços (Figura 30) e leu-se a absorvância nos comprimentos de onda 570 nm e 600 nm num espetrofotómetro Infinite M200 (TECAN$^{TM}$). Também foi medida a absorvância dos controlos negativos, e calculado o rácio 570 nm/600 nm de cada um, o qual foi subtraído aos rácios 570 nm/600 nm das amostras correspondentes.

Por fim, usou-se o rácio 570 nm/600 nm final para avaliar a viabilidade celular, tomando-se como 100% o valor do rácio 570 nm/600 nm final do controlo positivo (só células) ao dia 1. Os valores expressos para a resazurina correspondem à média de quatro réplicas biológicas para cada amostra. A análise estatística foi efetuada pela técnica ANOVA em combinação com o teste Turkey no *software* Origin. O valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

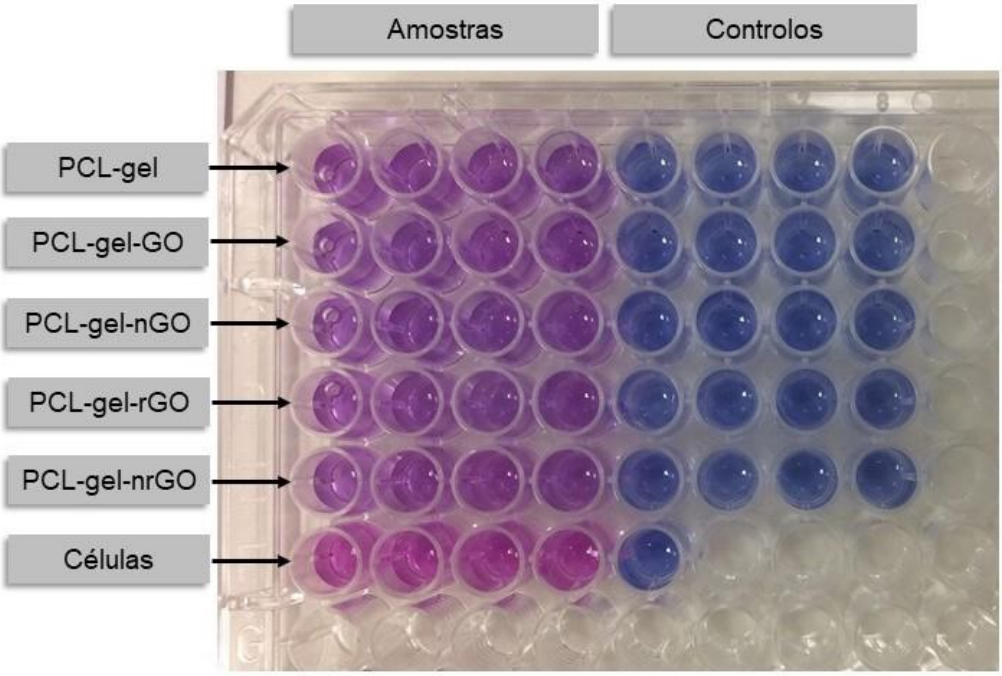



Figura 30 - Placa com meio com resazurina de amostras e controlos negativos.

### 3.4.3. Morfologia Celular

A morfologia celular foi analisada através de microscopia confocal (Zeiss LSM 510M) e SEM (Hitachi, TM4000Plus). Começou-se por fixar as células com PFA a 4%. Para a observação por microscopia confocal, as amostras foram embebidas em 500 µL de *Sudan Black B* (SBB), durante 30 minutos, na tentativa de se reduzir a autofluorescência das malhas e, de seguida, foi realizado um protocolo de imunocitoquímica descrito no Anexo 2.

Para a observação por SEM, procedeu-se à desidratação e secagem das amostras cultivadas segundo o protocolo do Anexo 3.

# 4. Resultados e Discussão

## 4.1. Propriedades Morfológicas

Através da combinação de agitação mecânica e ultrasonicação foi possível quebrar ligações químicas e, assim, reduzir o tamanho das folhas de GO.[76] A análise do gráfico da Figura 31 mostra que o tamanho das folhas de GO diminuiu ao longo do tempo de tratamento e que se obtiveram nanofolhas com tamanho adequado para a incorporação em nanofibras. O tamanho das folhas de GO sofreu uma redução acentuada durante os primeiros 30 minutos (de 787 nm para 250 nm), seguindo-se uma diminuição mais gradual (250 nm - 103 nm - 66 nm).

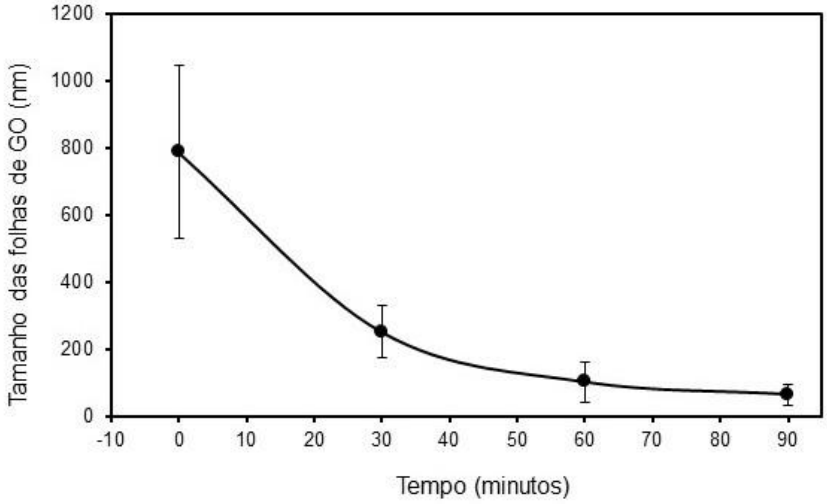



Figura 31 - Tamanho médio das folhas de GO em função do tempo de ultrasonicação.

Imagens SEM dos *scaffolds* eletrofiados mostram que, independentemente da percentagem de NC adicionada, as fibras apresentaram superfícies lisas e com uma rede de poros interconectados potenciadas pelas rotações por minuto utilizadas durante a eletrofiação. Nos compósitos com GO e rGO é possível observar três morfologias distintas: folhas estendidas e interligadas com as nanofibras Figura 32 d) e i) e Figura 33 c), d), e) e g)]; folhas enroladas à volta das fibras [Figura 32 c), e) e g)]; e folhas dentro das fibras que alargam o seu diâmetro [Figura 32 h) e Figura 33 b)]. Já nos casos em que as NC possuem menores dimensões, as folhas raramente são visíveis pois encontram-se maioritariamente dentro das fibras, exceto em alguns casos

pontuais [Figura 32 k) e q) e Figura 33 m) e p)]. Apesar de os diâmetros médios não apresentarem grandes variações (de 152 ± 50 nm a 207 ± 58 nm) [Figura 34 e), f), g) e h)], nas nanofibras com nGO e nrGO há uma diminuição do número de fibras com diâmetro inferior a 150 nm e um aumento do número de fibras com diâmetro superior a 200 nm (Figura 34 b) e d), respetivamente), corroborando a ideia de que as nanofolhas se encontram maioritariamente dentro das fibras.

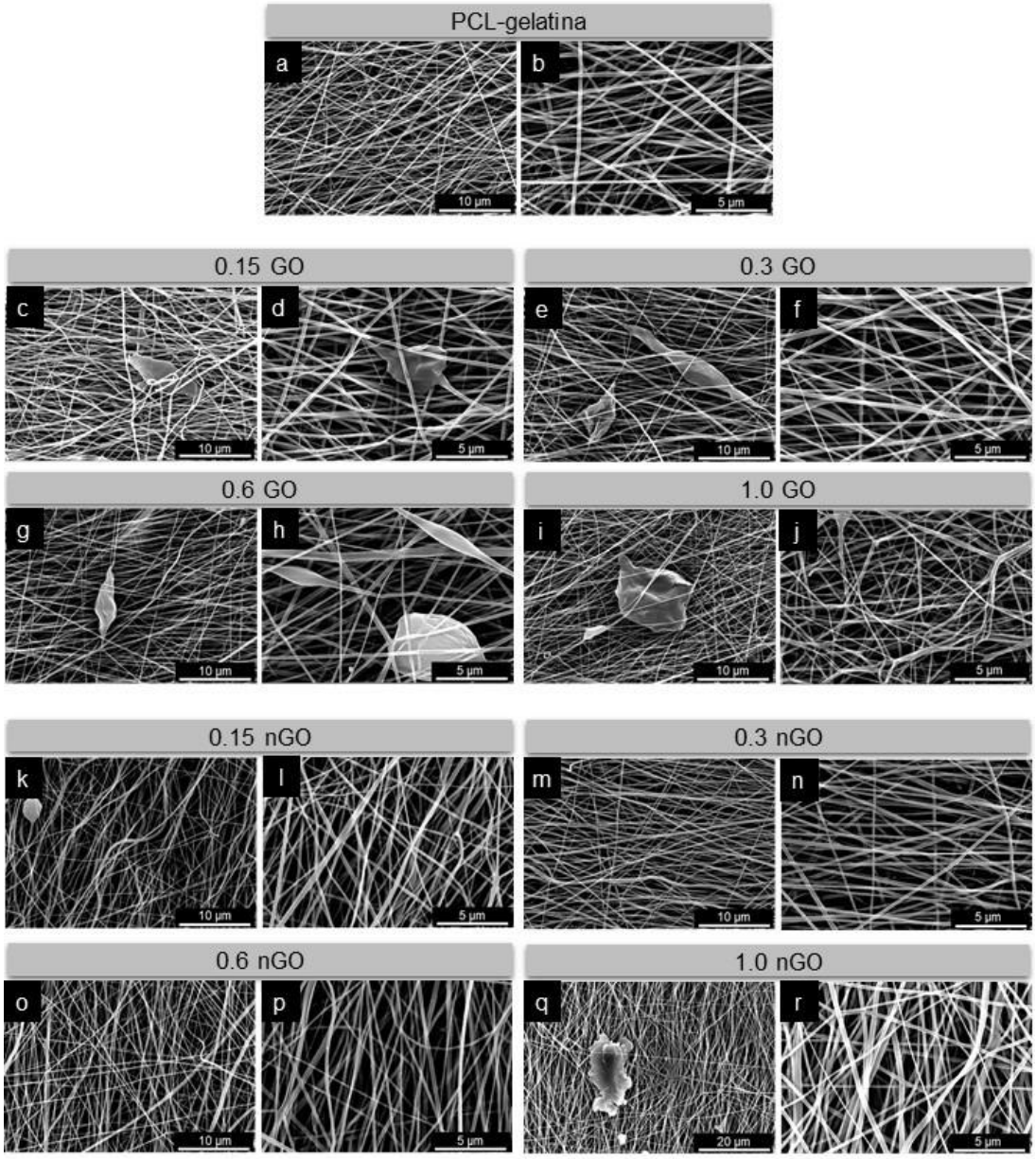



Figura 32 – Imagens SEM de nanofibras de (a e b) PCL-gelatina e de compósitos com diferentes concentrações de (c - j) GO e (k - r) nGO.

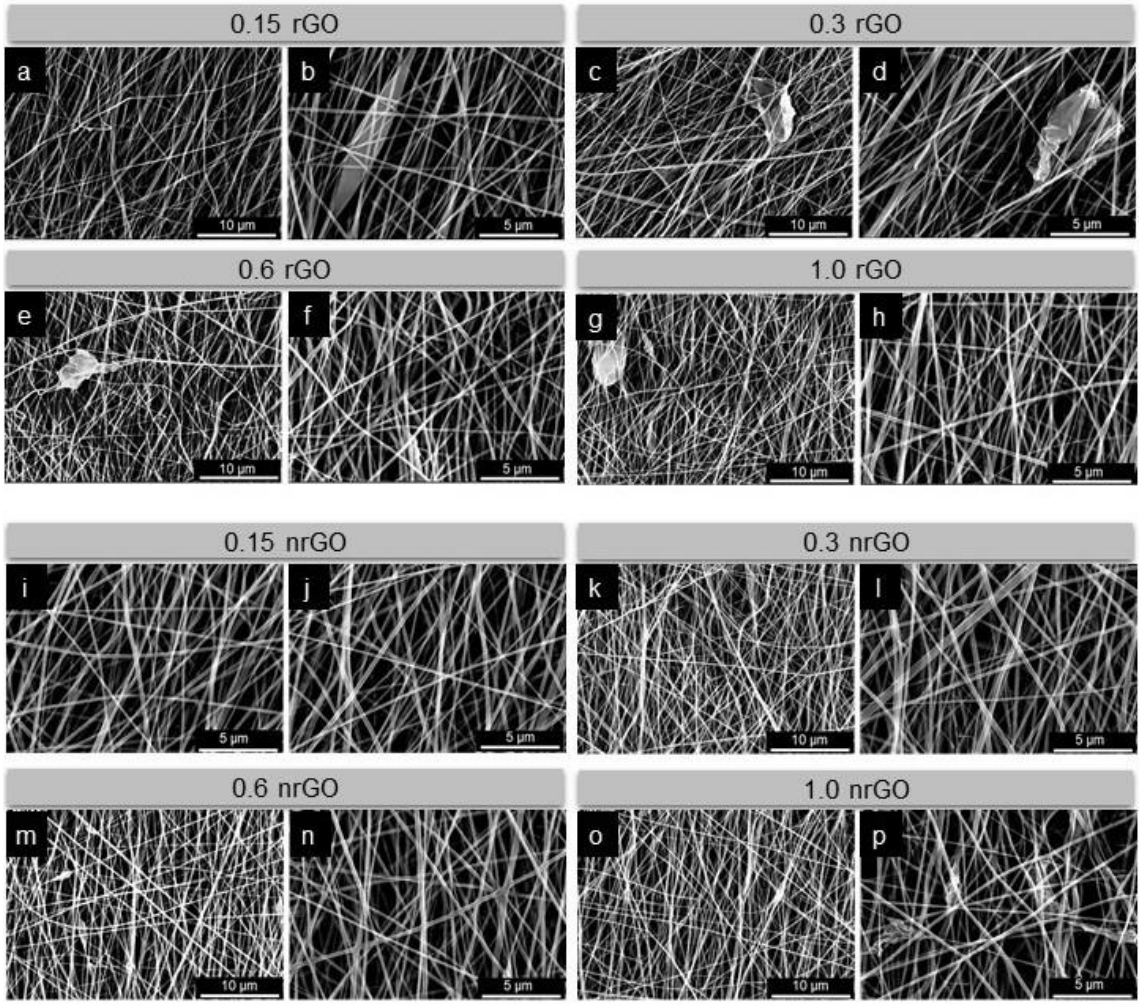



Figura 33 - Imagens SEM de nanofibras com diferentes concentrações de (a -h) rGO e (i - p) nrGO.

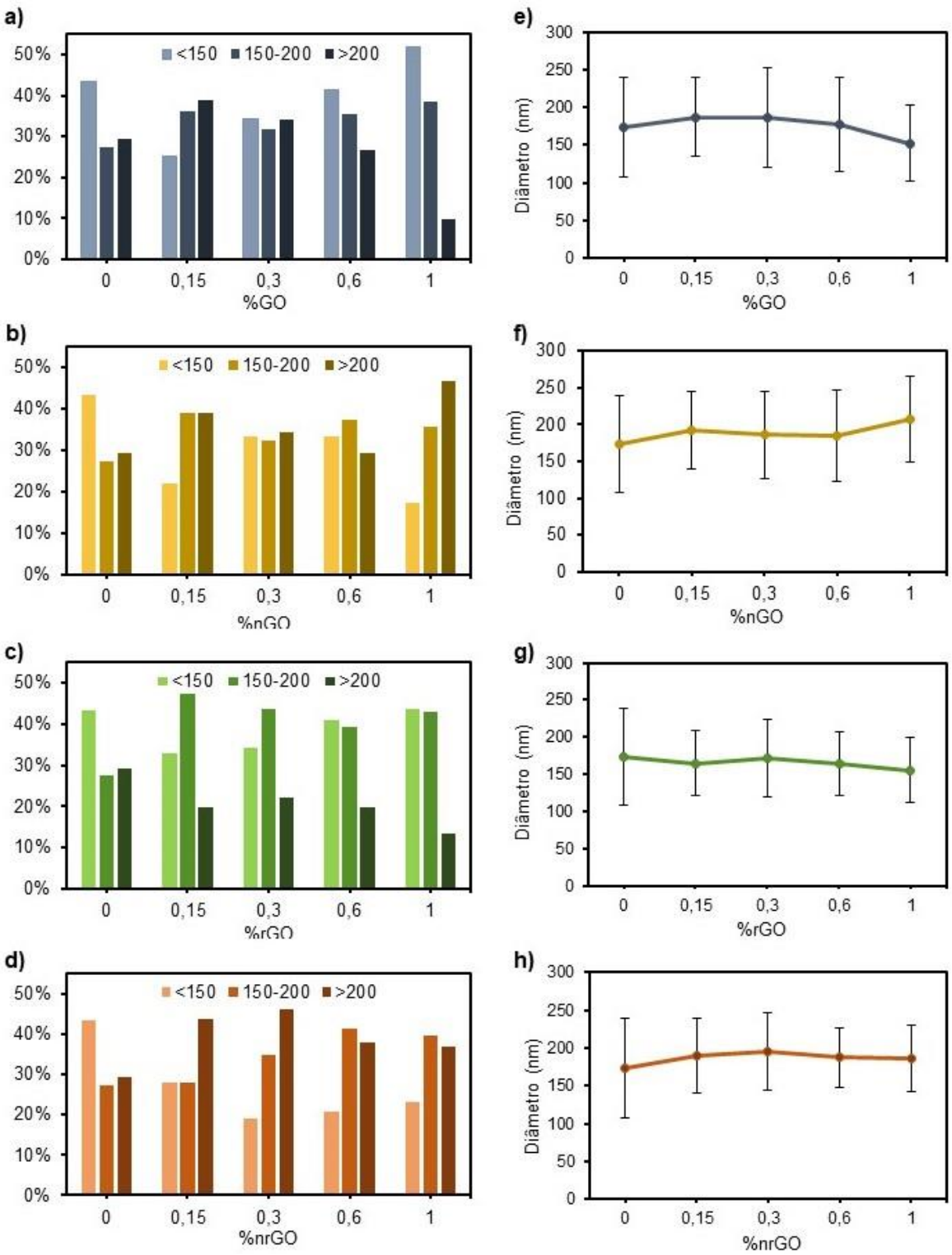



Figura 34 - (a), (b), (c) e (d) distribuição do tamanho dos diâmetros e (e), (f), (g) e (h) diâmetro médio das nanofibras em função do tipo e percentagem de NC.

## 4.2. Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas das nanofibras de PCL-gelatina com várias concentrações de GO, nGO, rGO e nrGO foram avaliadas usando testes de tração. As curvas de tensão deformação (Figura 35) mostram que o comportamento geral de deformação dos compósitos com NC foi semelhante ao do PCL-gelatina, que é uma curva típica de um material dúctil com uma região de deformação elástica e uma região plástica, sem patamar de escoamento definido (transição do regime elástico para o regime plástico).[79]

Nos nanocompósitos impregnados com GO e nGO, o E sofreu um aumento com o aumento da concentração das NC [Figura 36 a)]. Contudo, para o nGO o aumento foi mais acentuado devido, presumivelmente, ao menor tamanho das nanofolhas que, assim, estavam mais dentro da fibra (facto corroborado pelo aumento do número de fibras com diâmetro superior a 200 nm).

Além disso, os nanocompósitos contendo GO e nGO apresentaram um E superior ao das fibras contendo rGO e nrGO. No entanto, constatou-se que estas fibras apesar de mais rígidas, são menos deformáveis, ou seja, a falha ocorre prematuramente, daí a TR e a $\varepsilon_m$ serem menores do que nas matrizes onde está presente o GO reduzido [Figura 36 b) e c)].[70] Isso deve-se, provavelmente, à maior quantidade de ligações de hidrogénio estabelecidas entre as folhas GO e nGO com a gelatina e o PCL, proporcionando uma melhor dispersão da carga na matriz polimérica. [53]

Nas fibras com rGO não se verificaram grandes variações no E e na TR com a alteração da concentração. Pensa-se que isto ocorreu devido aos defeitos na malha provocados pelo tamanho das nanofolhas. Por outro lado, nas nanofibras impregnadas com nrGO, a TR e a $\varepsilon_m$ mudam com a variação da concentração das NC: por exemplo, estes valores aumentaram 46% e 13%, respetivamente, com a adição de nanofolhas até 0,6% em peso (ponto crítico), porém, para maiores concentrações, a distância entre as nanofolhas tornou-se menor e sua consequente aglomeração [Figura 32 q)] resultou numa menor resistência à rutura das malhas eletrofiadas - menor TR e $\varepsilon_m$. [70,80]

Estes resultados demonstram que as NC, em baixa concentração, podem dispersar-se bem na matriz polimérica de PCL-gelatina, e ser benéficas à

transferência de tensão da matriz para as nanofolhas, levando à melhoria do E e da TR dos *scaffolds* compósitos.

Tendo em conta esses resultados, todos os *scaffolds* eletrofiados apresentam características mecânicas e morfológicas compatíveis com protocolos de cultura de células para TE neural. Contudo, a concentração de 0,6 wt% parece ser aquela que possui maior equilibro entre o E, a TR e a $\varepsilon_m$ e espera-se que esta quantidade de NC seja suficiente para que os *scaffolds* com rGO e nrGO possuam propriedades condutoras para estudos com estimulação elétrica a serem realizados futuramente. [81] Por esse motivo, nos passos seguintes apenas foram utilizadas as amostras com esta concentração de NC.

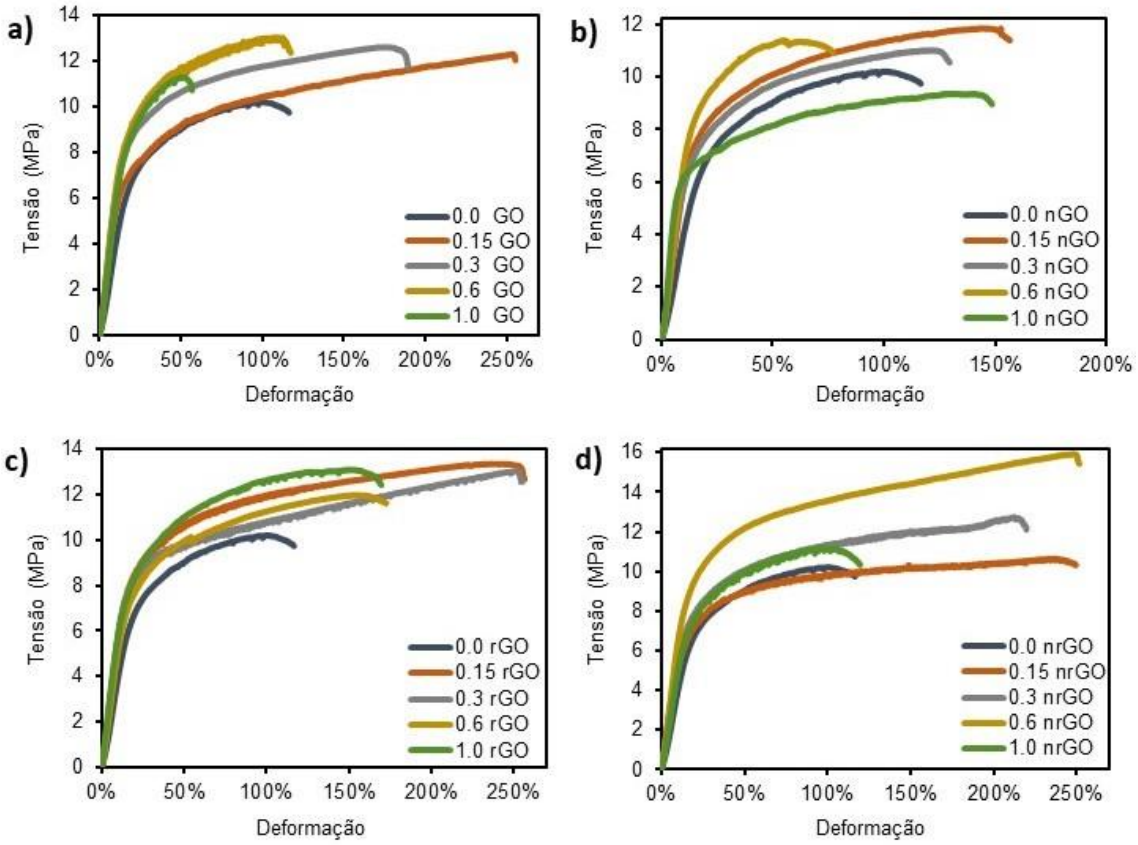



Figura 35 - Curvas tensão-deformação exemplo de nanofibras de PCL-gelatina com diferentes concentrações de (a) GO, (b) nGO, (c) rGO e (d) nrGO.

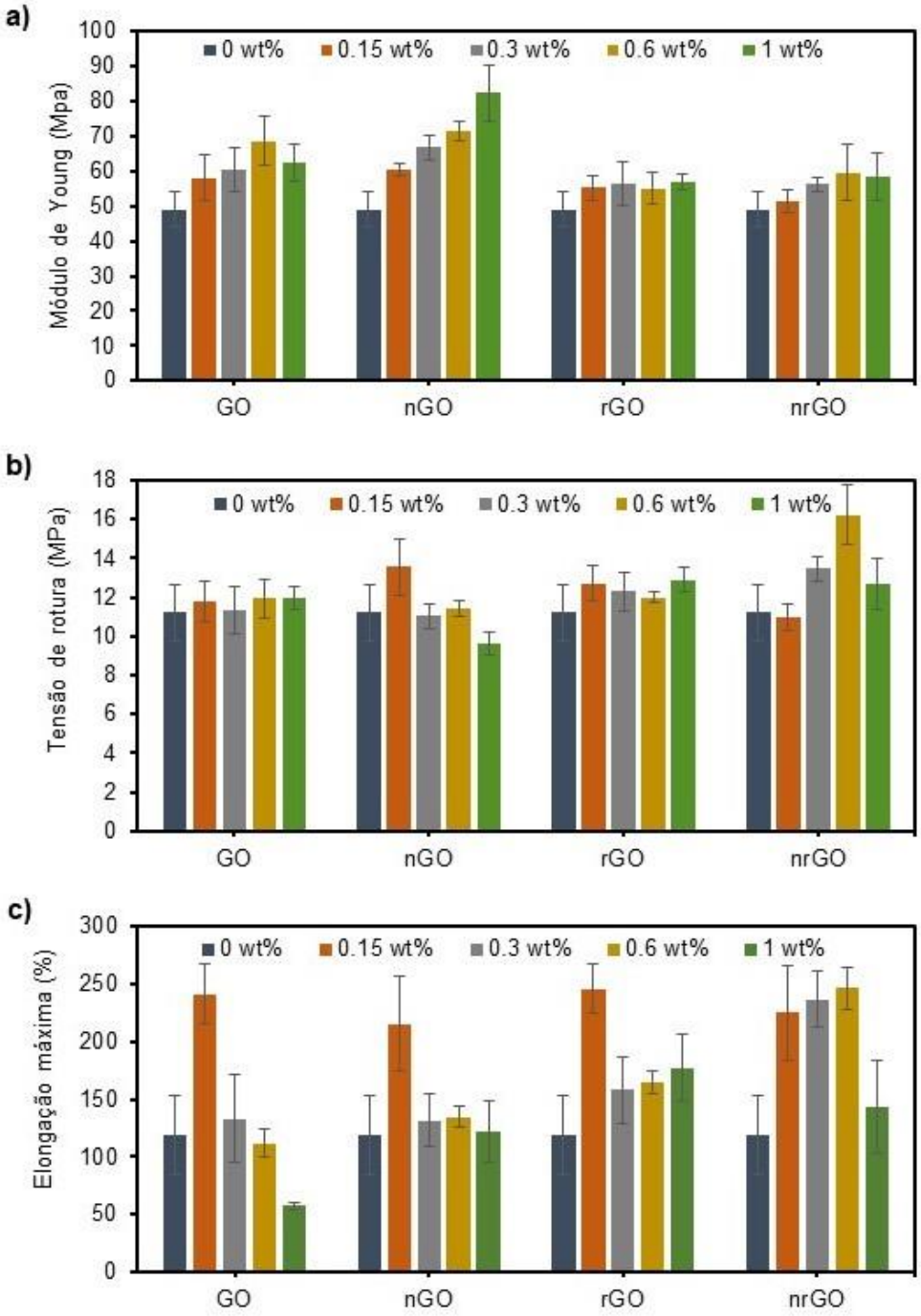



Figura 36 - (a) E, (b) TR e (c) $\varepsilon_m$, em função da concentração e do tipo NC adicionadas.

## 4.3. Caracterização Química

Os espectros ATR-FTIR das nanofibras de PCL-gelatina e dos compósitos com 0,6 % em peso dos quatro tipos de NC são apresentados na Figura 37.

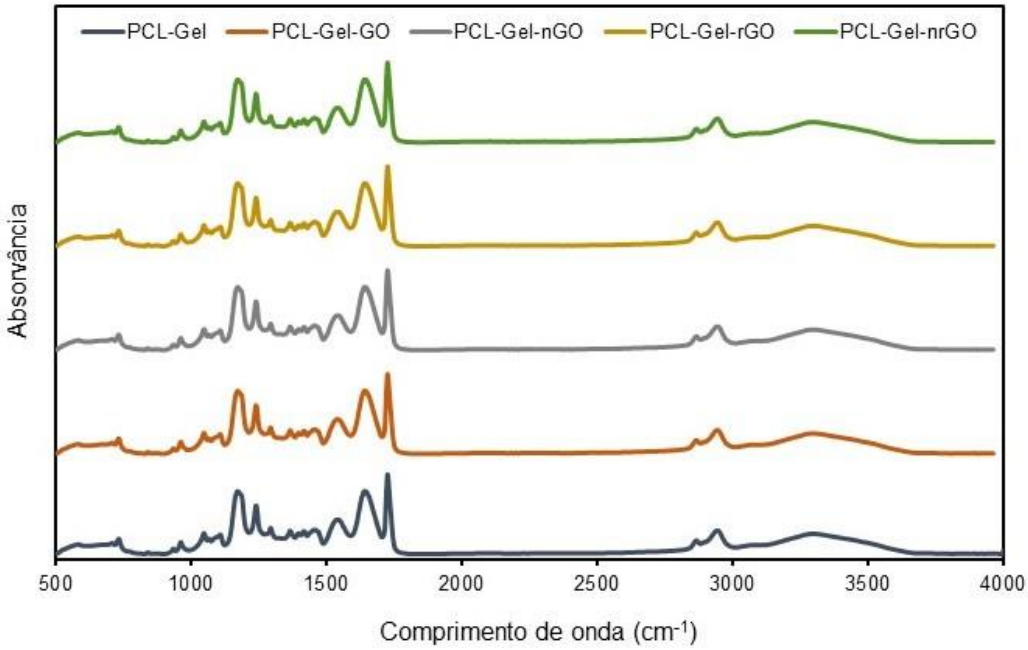



Figura 37 - Espetro ATR-FTIR da malha de PCL-gelatina e dos compósitos de PCL-gelatina-NC com 0.6 wt% dos quatro tipos de NC.

As bandas que correspondem ao PCL aparecem em 2944, 2866, 1725, 1293, 1239 e 1172 $cm^{-1}$ e correspondem ao estiramento assimétrico do grupo $CH_2$, estiramento simétrico do grupo $CH_2$, estiramento do grupo carbonilo (C=O), estiramento das ligações C–O e C–C, estiramento assimétrico do grupo C–O–C e estiramento simétrico do grupo C–O–C, respetivamente. Relativamente à gelatina, são identificadas as bandas correspondentes ao estiramento do grupo N–H (3312 $cm^{-1}$), à amida I (1641 $cm^{-1}$), devido principalmente ao estiramento da ligação C=O, e à amida II (1542 $cm^{-1}$), resultante do estiramento e deformação das ligações C–N e N–H, respetivamente.[53] Os picos característicos do GO estariam localizados a 3350, 1740, 1640, 1240, 1049, e 985 $cm^{-1}$ correspondendo ao grupos hidroxil, carboxil, carbonil, epóxi, alcóxi, e epóxi, respetivamente. [82] No entanto, estes picos não são identificáveis no espetro uma vez que a concentração de NC na matriz polimérica é bastante baixa e os seus picos se sobrepõem aos picos do PCL e da gelatina.

As mudanças conformacionais da estrutura secundária dos compósitos foram estimadas usando espectroscopia Raman, e os espectros são mostrados na Figura 38. No espetro da nanofibras de PCL-gelatina, Figura 38 a), os picos 2916 e 1723 $cm^{-1}$ foram atribuídos às vibrações de estiramento das ligações C-H e C=O, respetivamente. Os picos localizados em 1440 $cm^{-1}$ foram devidos às vibrações de *bending* da ligação C-H. Além disso, os picos em 1303, 1109 e 913 $cm^{-1}$ foram atribuídos à vibração de *wagging* da ligação C-H fora do plano, vibrações de estiramento do esqueleto e vibrações de estiramento da ligação C-C (grupo C-COO), respetivamente. Já nas nanofibras impregnadas com NC [Figura 38 b)], a intensidade das bandas poliméricas desapareceu, enquanto as bandas D e G (1304 e 1592 $cm^{-1}$, respetivamente) das NC puderam ser observadas claramente, o que confirma a presença das NC nas malhas e indica que podem haver algumas interações entre a matriz polimérica de PCL-gelatina e as NC. [55]

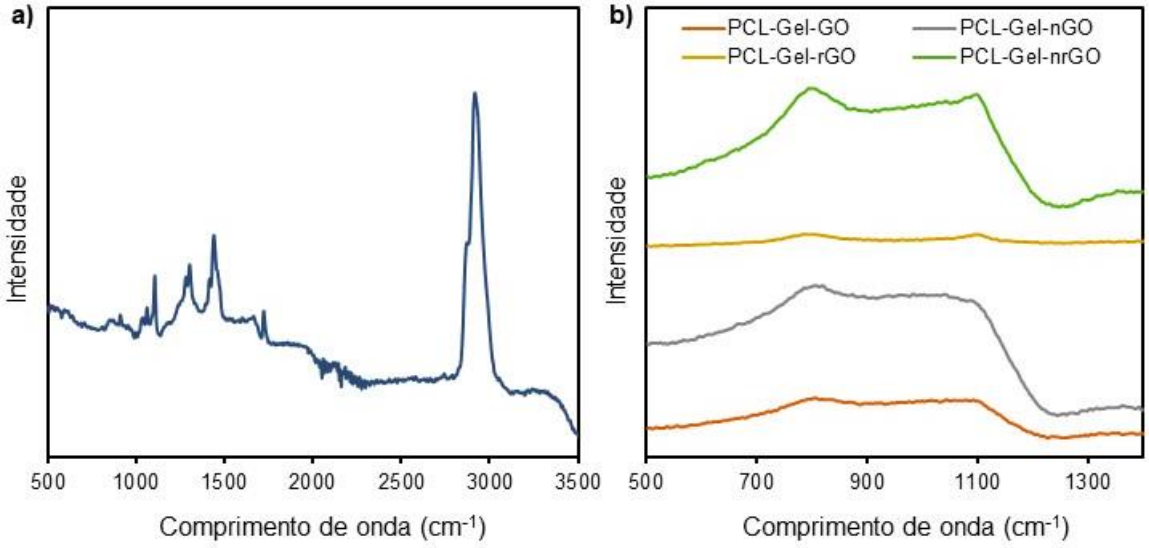



Figura 38 - Espetro Raman da malha de PCL-gelatina e dos compósitos de PCL-gelatina-NC com 0.6 wt% dos quatro tipos de NC.

## 4.4. Molhabilidade

A hidrofilicidade dos *scaffolds* eletrofiados tem um grande impacto na aplicação final das nanofibras na ET. Assim, o ângulo de contacto das nanofibras foi medido e está exposto nas Figura 39 e Figura 40. A medição foi realizada em quatro instantes distintos porque não havia uma estabilização das gotas, sendo que, em alguns casos, a gota de água era imediatamente absorvida pelas nanofibras, obtendo-se um ângulo de contacto de 0° aos 10 segundos.

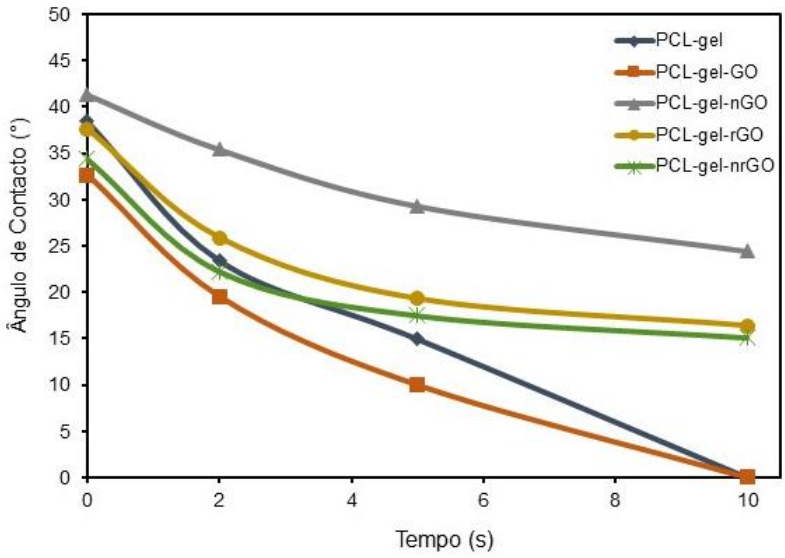



Figura 39 - Evolução do ângulo de contacto de nanofibras de PCL-gelatina e de compósitos de PCL-gelatina com 0,6 wt% de NC ao longo do tempo.

As nanofibras de PCL-gelatina mostraram ser hidrofílicas, como era esperado, e a adição de GO aumentou ainda mais a afinidade do *scaffold* com a água. Este fenómeno pode ser atribuído não só à melhor polaridade da superfície na presença de grupos funcionais oxigenados nas folhas de GO, mas também à possibilidade de existirem ligações de hidrogénio entre a matriz polimérica e as folhas de GO.[53] Tal não se verifica com a presença de nGO, uma vez que o ângulo de contacto medido é superior ao do PCL-gelatina. Este carácter mais hidrofóbico poderá ter dois motivos. Por um lado, a menor hidrofilicidade das mantas com nGO pode estar relacionada com a topografia das malhas já que, analisando a distribuição do diâmetro das fibras, verifica-se que a malha com 0.6% de nGO é a que apresenta um maior “equilíbrio” de tamanhos e isso deve conferir uma topografia mais fechada à malha, eventualmente menos porosa,

conferindo assim menor hidrofilicidade. Por outro lado, poderá estar relacionado com o processo de redução do tamanho das folhas de GO via ultrassons, onde terá ocorrido, pontualmente, a eliminação de grupos funcionais oxigénio (COOH e C=O) e a sua substituição por ligações $CH_2$, conferindo um grau mais hidrofóbico às nanofolhas. De salientar também que este processo poderá também ter originado defeitos na estrutura cristalina do nGO. Após a redução química com hidrazina, os grupos oxigenados foram maioritariamente eliminados, daí os *scaffolds* com rGO e nrGO apresentarem um ângulo de contacto ligeiramente maior ao do PCL-gelatina.[83] Ao contrário do que seria de esperar, os ângulos de contacto medidos nas amostras com NC reduzidas foram inferiores ao do compósito PCL-gelatina-nGO, teoricamente mais hidrofílico. Uma possível explicação para este resultado é a restruturação da estrutura cristalina do nGO durante o processo de redução, que consequentemente levou a uma redução dos defeitos, induzidos pelos ultrassons e à diminuição do ângulo de contacto.[84,85]

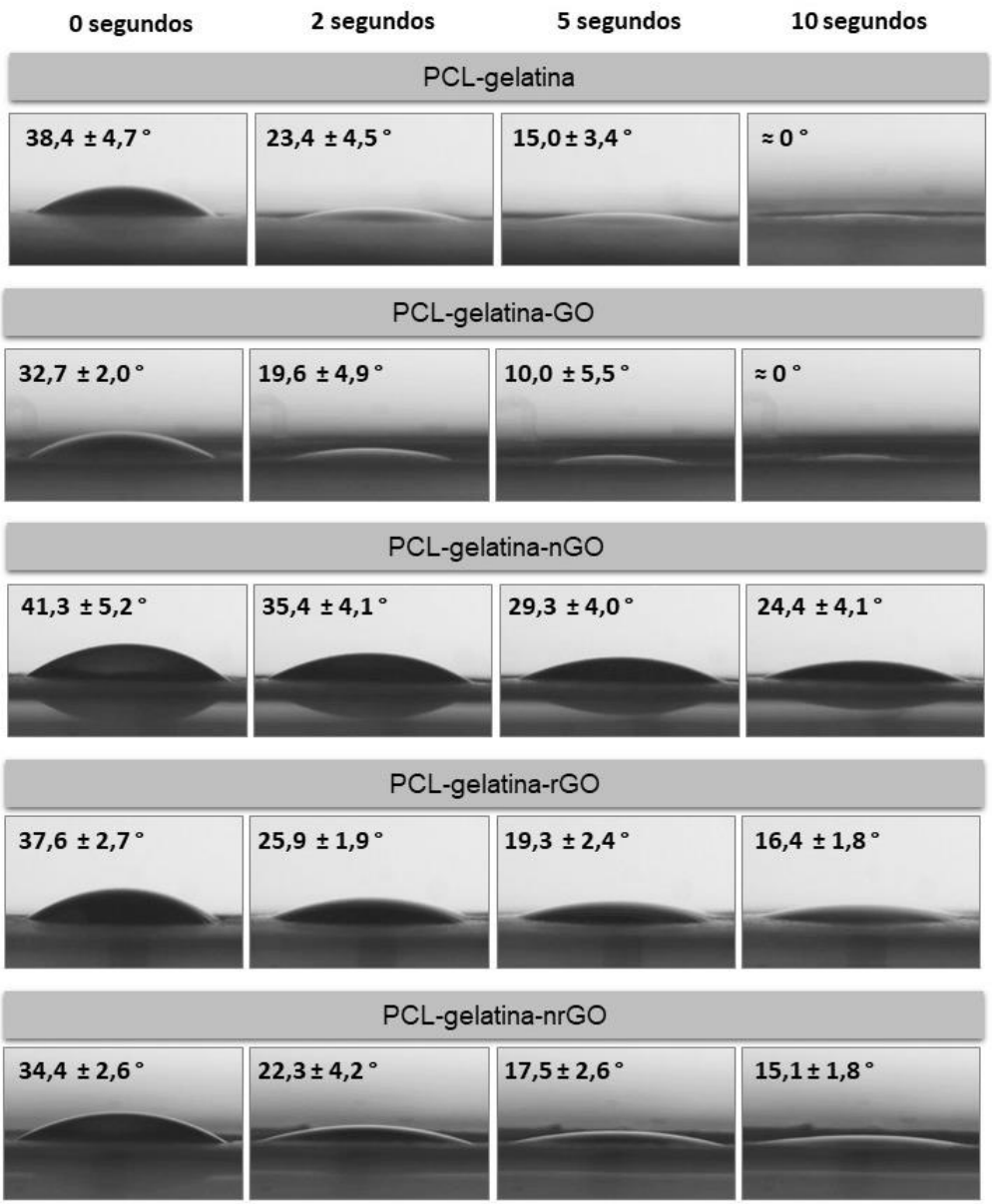



Figura 40 - Ângulo de contacto de nanofibras de PCL-gelatina e de compósitos de PCL-gelatina com 0,6 wt% de NC aos 0, 2, 5 e 10 segundos.

## 4.5. Biocompatibilidade

Microscopia confocal e SEM foram usadas para estudar a morfologia, adesão e proliferação celular nos *scaffolds* com 0.6 wt% de NC após sete dias de cultura.

Como se confirmou que as nanofibras apresentavam autofluorescência [86] [Figura 41 a)], foi realizado um tratamento com SBB na tentativa de ultrapassar este inconveniente. No entanto, apesar de ter havido alguma redução, os *scaffolds* ainda apresentaram um nível de fluorescência considerável [Figura 41 b) e c)], o que dificultou a observação do citoesqueleto das células e resultou em imagens com ruído.

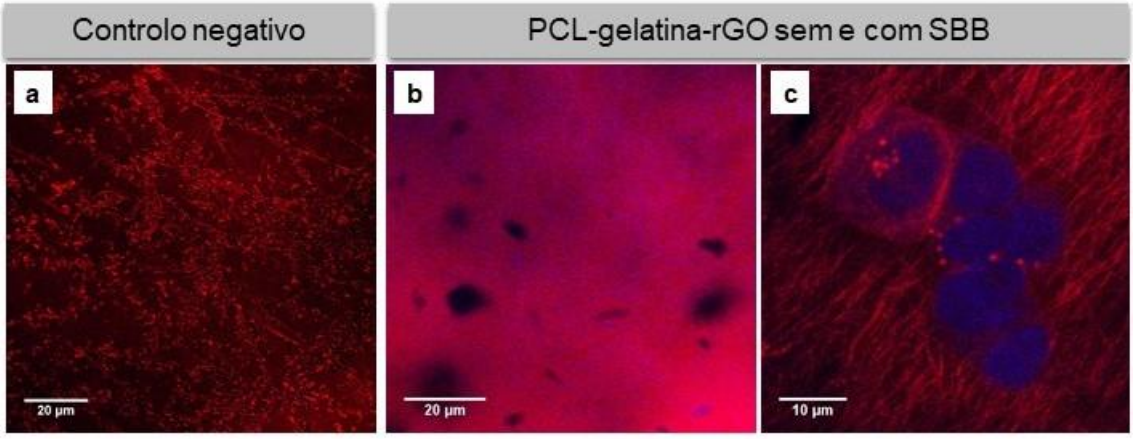



Figura 41 - Imagens de microscopia confocal de (a) uma amostra de PCL-gelatina-nrGO não submetida ao protocolo de imunocitoquímica e (b) e (c) de amostras de PCL-gelatina-rGO, submetidas ao protocolo de imunocitoquímica (núcleo a azul e F-actina a vermelho), sem e com SBB, respetivamente.

Ainda assim, a Figura 42 mostra que houve adesão, que as células possuíam um fenótipo normal [87], incluindo células mais arredondadas e outras mais distendidas com prolongamentos, e que os filamentos de actina se encontravam intactos. De um modo geral, as imagens SEM (Figura 43 e Figura 44) corroboram as afirmações anteriores e confirmam ainda que a população cresceu em *clusters*, como é habitual em populações de células SH-SY5Y indiferenciadas. [77] Para além disso, é visível que as células se encontram bem distribuídas ao longo dos *scaffolds* e que estes permitiram a formação de prolongamentos citoplasmáticos, muitos orientados ao longo da direção das fibras. A formação destes prolongamentos pode ser um indicador de que a células terão a capacidade de diferenciar futuramente, alcançando uma morfologia mais neuronal.[88]

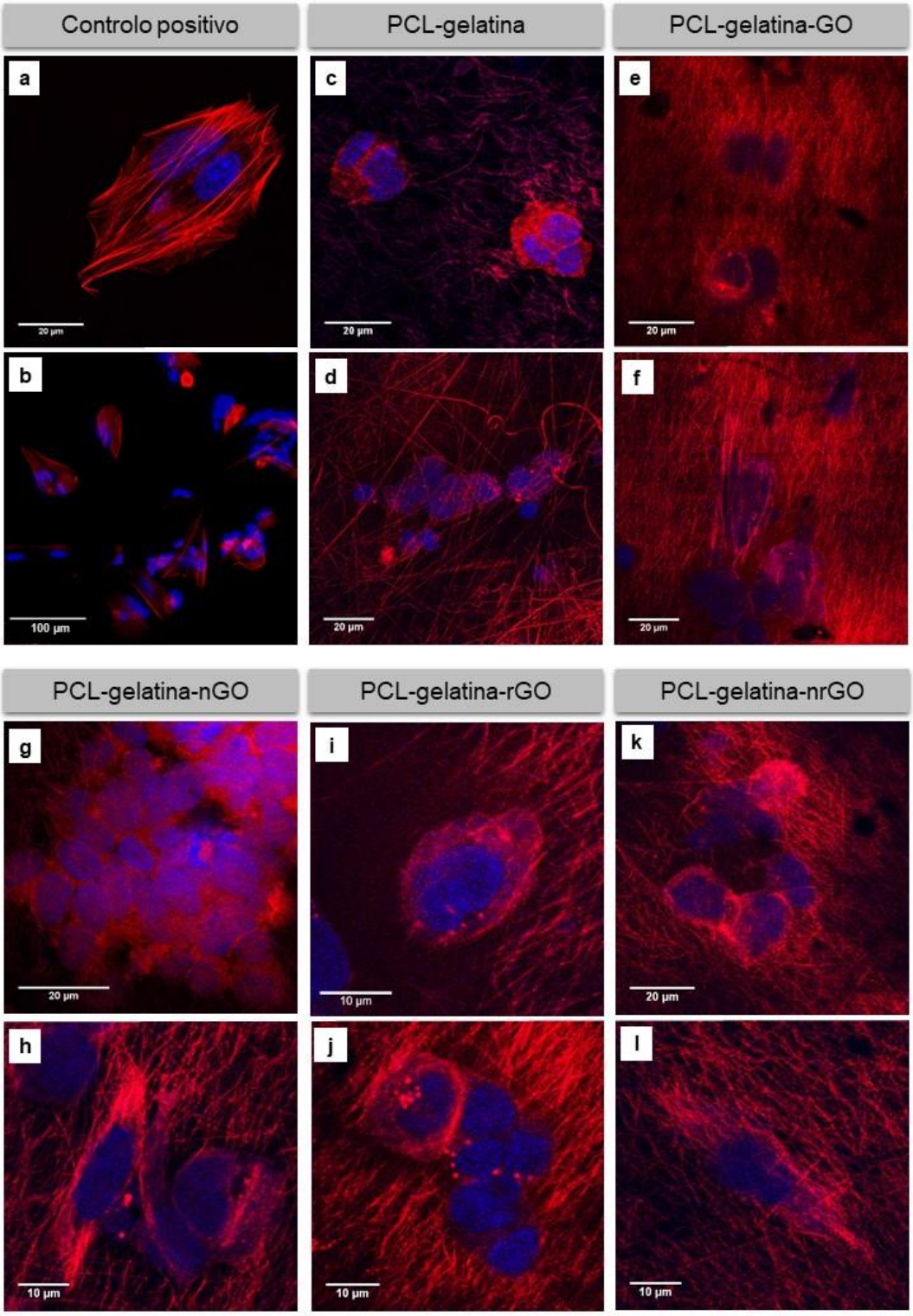



Figura 42 - Efeito das nanofibras com diferentes NC na morfologia das células SH-SY5Y através de microscopia confocal. O núcleo das células encontra-se marcado a azul enquanto que a actina filamentosa (F-actina) se encontra marcada a vermelho.

O compósito de PCL-gelatina-rGO parece ter sido o menos bem sucedido, já que as Figura 42 i) e j) mostram que a morfologia celular dominante é a arredondada (potencialmente por mais adesões célula-célula e menos célula-

substrato), e na Figura 44 a) nota-se a presença de detritos celulares, o que indica que as folhas de rGO presentes no exterior das nanofibras podem ser prejudiciais para a atividade celular. Em contrapartida, o compósito com folhas de GO reduzido de menor dimensão (PCL-gelatina-nrGO), maioritariamente localizadas dentro das fibras, parece ter sido o que melhor promoveu a formação de prolongamentos citoplasmáticos [Figura 42 i) e Figura 44 c)].

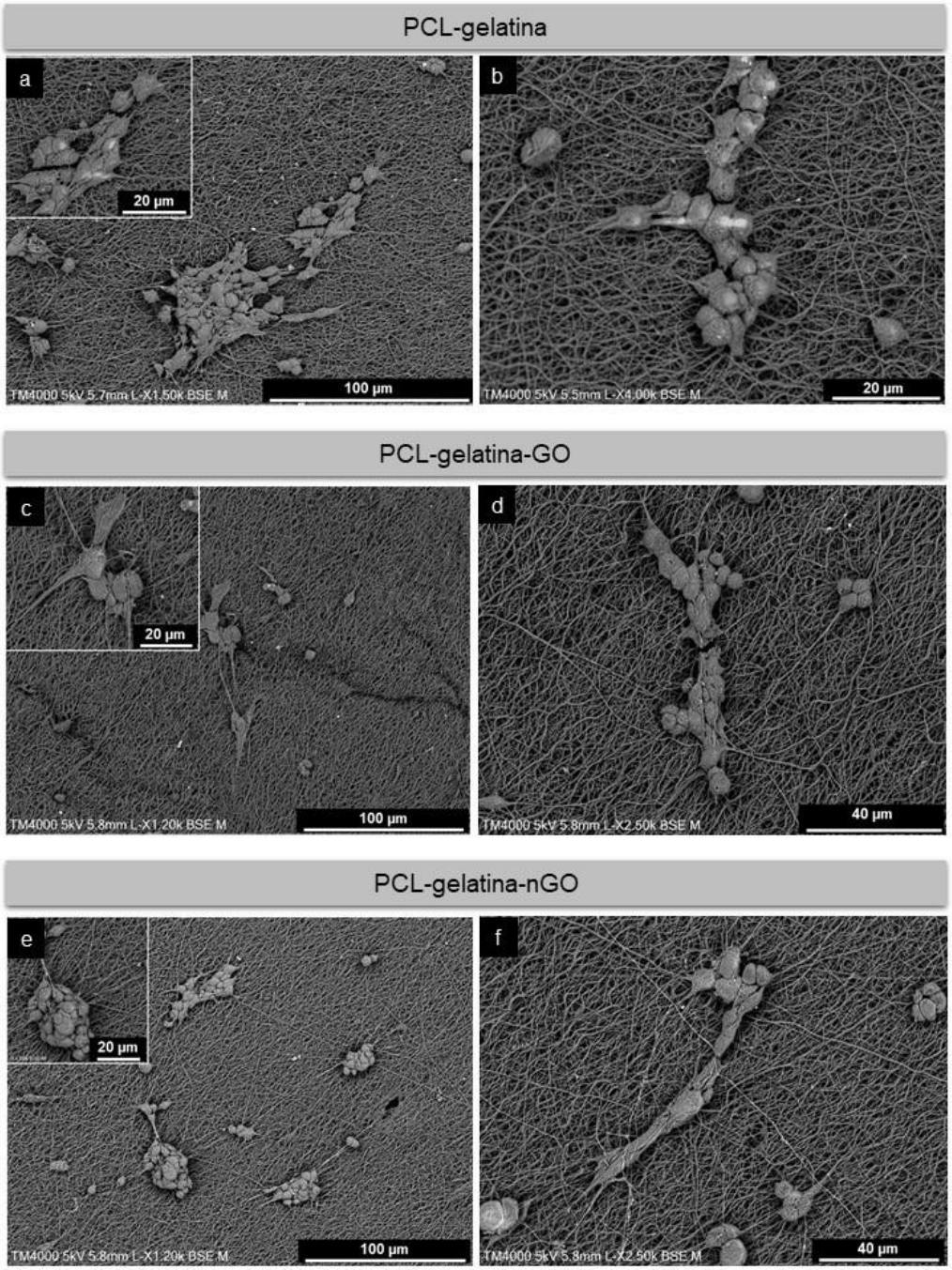



Figura 43 - Imagens SEM de células SH-SY5Y em nanofibras de PCL-gelatina e em compósitos de PCL-gelatina com GO e nGO.

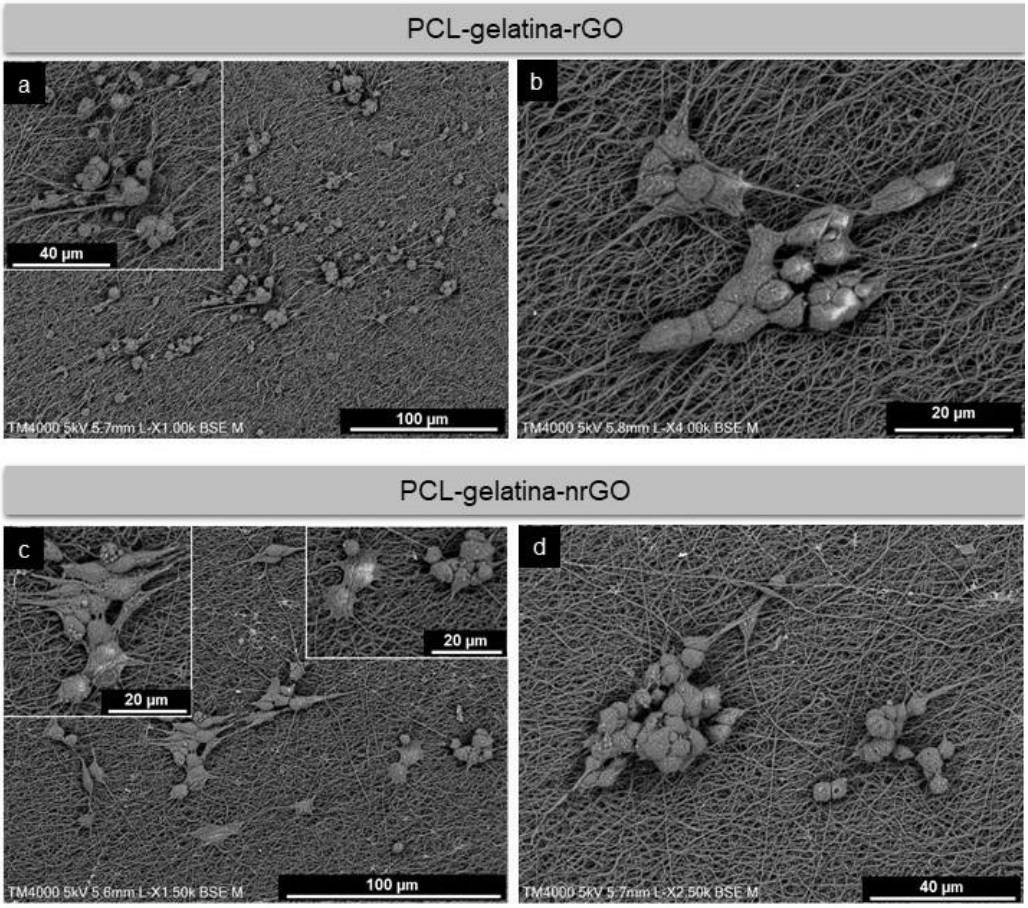



Figura 44 - Imagens SEM de células SH-SY5Y em compósitos de PCL-gelatina com rGO e nrGO.

A viabilidade celular das SH-SY5Y cultivadas em *scaffolds* foi avaliada através de ensaios de resazurina efetuados ao longo da cultura celular nos dias 1, 2, 4 e 7 e comparada com células semeadas numa lamela às quais foi atribuído um valor de viabilidade de 100%.

Analisando a Figura 45, verifica-se que não houve uma variação estatisticamente significativa entre os valores de viabilidade das células cultivadas nos cinco *scaffolds*, o que indica que a adição de NC na matriz polimérica de PCL-gelatina não modifica significativamente a sua biocompatibilidade. A taxa de proliferação do controlo positivo até ao quarto dia foi bastante superior à taxa de proliferação nas nanofibras, o que é compreensível já que as placas de cultura promovem a proliferação. Mas a partir desse *timepoint* houve uma grande recuperação por parte dos *scaffolds*, mostrando taxas de proliferação mais elevadas. Estes resultados encorajam a realização de culturas celulares superiores a 7 dias.

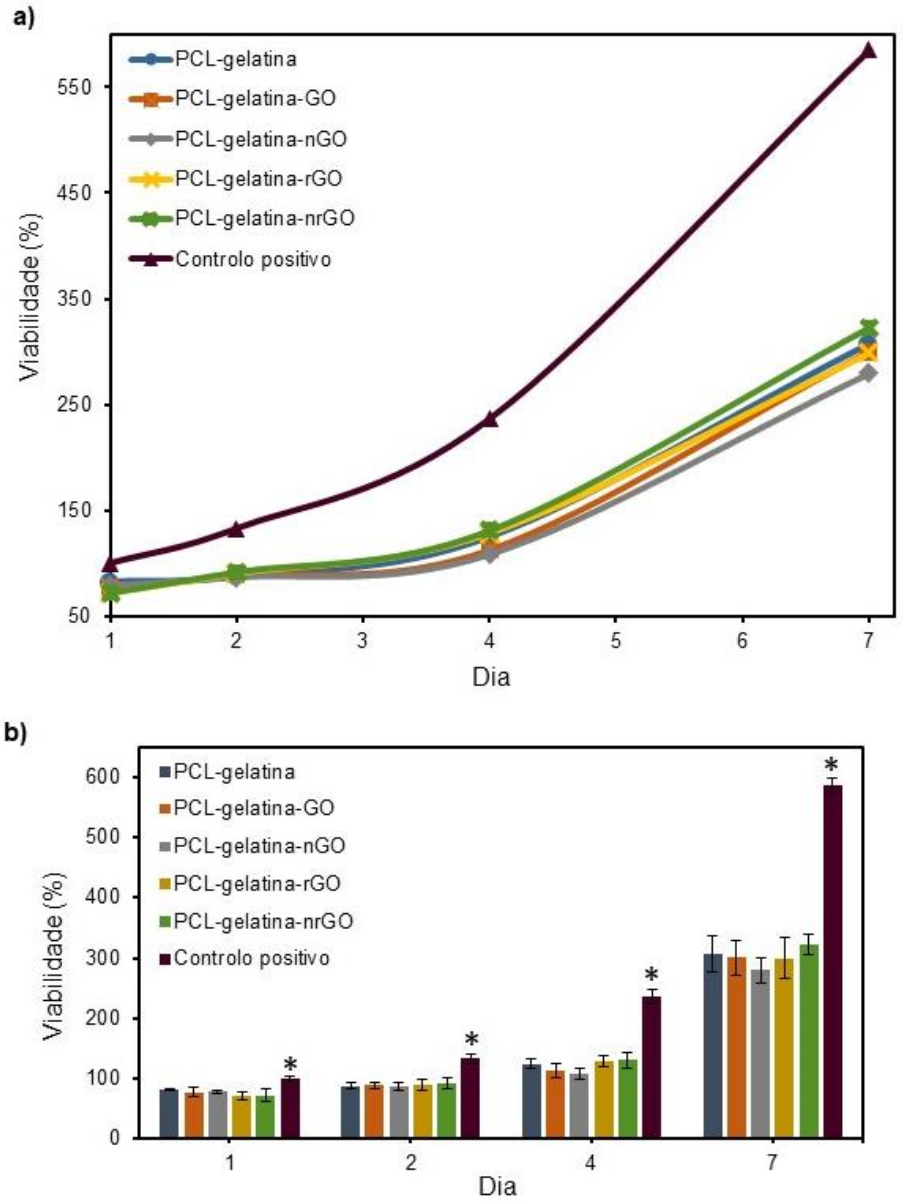



Figura 45 – (a) e (b) Efeito das nanofibras na viabilidade celular das SH-SY5Y. Os asteriscos (*) indicam as diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$).

# 5. Conclusão e Trabalhos futuros

Neste estudo, foram fabricadas e caracterizadas nanofibras eletrofiadas de PCL-gelatina com quatro derivados de grafeno com composição química e tamanho distintos (GO, nGO, rGO e nrGO). A avaliação da influência da concentração destas NC na morfologia e propriedades mecânicas das nanofibras demostrou que, de um modo geral, a adição de NC à matriz polimérica reforça-a, levando a um aumento do E, TR e $\varepsilon_m$ sem comprometer a topografia, interconectividade e diâmetro das nanofibras. No entanto, a variação do nível de redução e do tamanho das nanofolhas de GO conduziu a variações distintas nas propriedades mecânicas, sendo selecionados os compósitos com 0.6 % em peso de NC por apresentarem um bom equilíbrio dos três parâmetros mecânicos avaliados. Apesar desta concentração não ser suficiente para se encontrarem diferenças significativas na análise dos espetros ATR-FTIR, foi possível identificar a presença das NC na matriz polimérica a partir de espetros Raman. Adicionalmente, a influência das NC na superfície das fibras foi confirmada a partir de análises dos ângulos de contacto, confirmando uma menor hidrofilicidade na presença de rGO e nrGO e uma diminuição do ângulo de contacto com a adição de GO. Inesperadamente, a adição de nGO levou a um aumento da hidrofobicidade das nanofibras. Tal pode ser, no entanto, justificado com o facto de nessa amostra o diâmetro das fibras ser muito idêntico conferindo um tamanho de poro menor ou com processo adotado para diminuir o tamanho das folhas de GO, que pode ter originado o aumento do número de defeitos e destruição parcial da estrutura cristalina do nGO. Assim, futuramente deverão ser feitas análises de cristalografia de raios X (XRD) de modo a confirmar se realmente é este o motivo para a diminuição da hidrofilia destas amostras. Todavia, há que salientar que todos os compósitos se mostraram níveis de hidrofililicidade compatíveis com cultura celular. Estudos posteriores poderão incluir testes de condutividade para avaliar qual *scaffold* é mais adequado para conduzir padrões elétricos e análises por espectroscopia de fotoeletrões excitados por raios X (XPS) para averiguar as interações químicas entre as NC e a matriz PCL-gelatina.

Após o processo de caracterização, os *scaffolds* selecionados foram cultivados com células do tipo neuronal, que apresentaram uma morfologia e

distribuição típica de populações indiferenciadas: clusters de células arredondadas (aderentes umas às outras) e mais achatadas (aderentes ao *scaffold*) com alguns prolongamentos citoplasmáticos na periferia, neste caso mais orientados na direção das nanofibras. Os valores de viabilidade celular encorajam a realização de ensaios celulares superiores a sete dias. Ao contrário dos outros *scaffolds*, o compósito PCL-gelatina-rGO parece ter induzido uma ligeira citotoxicidade nas células SH-SY5Y, que apesar de não terem apresentado um valor de viabilidade celular significativamente menor ao das células presentes nas outras malhas, apresentaram uma morfologia maioritariamente arredondada e a presença de alguns detritos celulares. Em contrapartida, no compósito PCL-gelatina-nrGO, com as nanofolhas localizadas maioritariamente dentro das nanofibras, verificou-se uma maior quantidade de células aderentes e com maior número de prolongamentos citoplasmáticos. Poderá ser interessante no futuro verificar o estado de diferenciação destas células com marcadores de diferenciação neuronal (por exemplo, βIII- tubulina, MAP2, sinaptofisina). [77] Futuros estudos incluirão, na cultura celular, estimulação elétrica [74] e/ou a adição de fatores de diferenciação [87].

# 6. Bibliografia


(1) Saladin, K. *Anatomy & Physiology: The Unit of Form and Function*, 7ª Edição.; McGraw-Hill Education, 2015.

(2) Tortora, G. J. *Corpo Humano*, 4ª Edição.; Artmed, 1997.

(3) NINDS. Traumatic Brain Injury: Hope Through Research. *Natl. Institutes Heal.* **2015**, *16* (158), 1–53.

(4) Siqueira, R. Lesões Nervosas Periféricas: Uma Revisão. *Rev. Neurociências* **2007**, *15* (3), 226–233.

(5) Simpson, L.; Eng, J.; Hsieh, J.; Wolfe, D. The Health and Life Priorities of Individuals with Spinal Cord Injury: A Systematic Review. *J. Neurotrauma* **2012**, *29* (8), 1548–1555.

(6) *Medical, Psychosocial and Vocational Aspects of Disability*, 3ª edição.; Brodwin, M., Siu, F., Howard, J., Brodwin, E., Eds.; Elliot & Fitzpatrick, Inc., 2009.

(7) Rosberg, H.; Carlsson, K.; Cederlund, R.; Ramel, E.; Dahlin, L. Costs and Outcome for Serious Hand and Arm Injuries during the First Year after Trauma - A Prospective Study. *BMC Public Health* **2013**, *13* (1), 1–7.

(8) Leibson, C.; Brown, A.; Hall Long, K.; Ransom, J.; Mandrekar, J.; Osler, T.; Malec, J. Medical Care Costs Associated with Traumatic Brain Injury over the Full Spectrum of Disease: A Controlled Population-Based Study. *J. Neurotrauma* **2012**, *29* (11), 2038–2049.

(9) The national SCI statistical center. Spinal Cord Injury (SCI) 2016 Facts and Figures at a Glance. *J. Spinal Cord Med.* **2016**, *39* (4), 493–494.

(10) Silva, N. A.; Sousa, N.; Reis, R. L.; Salgado, A. J. From Basics to Clinical: A Comprehensive Review on Spinal Cord Injury. *Prog. Neurobiol.* **2013**, *114*, 25–57.

(11) Kabu, S.; Gao, Y.; Kwon, B. K.; Labhasetwar, V. Drug Delivery, Cell-Based Therapies, and Tissue Engineering Approaches for Spinal Cord Injury. *J. Control. Release* **2015**, *219*, 141–154.

(12) Portolés, M.; Serrano, M. Potentiality of Graphene-Based Materials for Neural Repair. In *Graphene-based Materials in Health and Environment: New Paradigms*; Gil, G., Marques, P., Vila, M., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 159–190.

(13) Cao, H.; Liu, T.; Chew, S. Y. The Application of Nanofibrous Scaffolds in Neural Tissue Engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (12), 1055–1064.

(14) Murphy, A. R.; Laslett, A.; O'Brien, C. M.; Cameron, N. R. Scaffolds for 3D in Vitro Culture of Neural Lineage Cells. *Acta Biomater.* **2017**, *54*, 1–20.

(15) Domínguez-Bajo, A.; González-Mayorga, A.; López-Dolado, E.; Serrano, M. C. Graphene-Derived Materials Interfacing the Spinal Cord: Outstanding in Vitro and in Vivo Findings. *Syst. Neurosci.* **2017**, *11* (71), 1–8.

(16) Akhavan, O.; Ghaderi, E.; Shirazian, S. A.; Rahighi, R. Rolled Graphene Oxide Foams as Three-Dimensional Scaffolds for Growth of Neural Fibers Using Electrical Stimulation of Stem Cells. *Carbon N. Y.* **2016**, *97*, 71–77.

(17) Li, N.; Zhang, Q.; Gao, S.; Song, Q.; Huang, R.; Wang, L.; Liu, L.; Dai, J.; Tang, M.; Cheng, G. Three-Dimensional Graphene Foam as a Biocompatible and

Conductive Scaffold for Neural Stem Cells. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1–6.

(18) Guo, W.; Zhang, X.; Yu, X.; Wang, S.; Qiu, J.; Tang, W.; Li, L.; Liu, H.; Wang, Z. L. Self-Powered Electrical Stimulation for Enhancing Neural Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Graphene–Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Hybrid Microfibers. *ACS Nano* **2016**, *10* (5), 5086–5095.

(19) Van de Graaff, K. M. *Anatomia Humana*; Manole, 2003.

(20) Drake, R. L.; Vogl, A. W.; Mitchell, A. W. M. *Gray's Anatomy for Students*, 3ª Edição.; Churchill Livingstone, 2015.

(21) Tian, L.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S. Strategies for Regeneration of Components of Nervous System: Scaffolds, Cells and Biomolecules. *Regen. Biomater.* **2015**, 1–15.

(22) OpenStax. *Anatomy & Physiology*; OpenStax CNX, 2016.

(23) Seely, Rod; Stephens, Trent; Tate, P. *Anatomia e Fisiologia*; 2005.

(24) Palastanga, N. F.; Soames, R. *Anatomy and Human Movement: Structure and Function*, 6ª edição.; Churchill Livingstone, 2012.

(25) Seeley, R. R.; Stephens, T. D.; Tate, F. *Anatomy & Physiology*, 9ª edição.; 2016.

(26) Jacob, S. W.; Francone, C. A.; Lossow, W. J. *Anatomia e Fisiologia Humana*, 5ª Edição.; Editora Guanabara Koogan S.A: Rio de Janeiro, 1990.

(27) World Health Organization; ISCOS. *International Perspectives on Spinal Cord Injuty*; Bickenbach, J., Ed.; World Health Organization: Malta, 2013.

(28) Winterton, R. I. S.; Kay, S. P. J. Nerve Injury. In *Disorders of the Hand*; Springer: Londres, 2015; Vol. 1, pp 23–43.

(29) Straley, K. S.; Foo, C. W. P.; Heilshorn, S. C. Biomaterial Design Strategies for the Treatment of Spinal Cord Injuries. *J. Neurotrauma* **2010**, *27* (1), 1–19.

(30) Subramanian, A.; Krishnan, U.; Sethuraman, S. Development of Biomaterial Scaffold for Nerve Tissue Engineering: Biomaterial Mediated Neural Regeneration. *J. Biomed. Sci.* **2009**, *16* (1), 108–119.

(31) Tsintou, M.; Dalamagkas, K.; Seifalian, A. M. Advances in Regenerative Therapies for Spinal Cord Injury: A Biomaterials Approach. *Neural Regen. Res.* **2015**, *10* (5), 726–742.

(32) Dewan, M. C.; Rattani, A.; Gupta, S.; Baticulon, R. E.; Hung, Y.-C.; Punchak, M.; Agrawal, A.; Adeleye, A. O.; Shrime, M. G.; Rubiano, A. M.; et al. Estimating the Global Incidence of Traumatic Brain Injury. *J. Neurosurg.* **2018**, 1–18.

(33) Oliveira, E.; Lavrador, J. P.; Santos, M. M.; Lobo Antunes, J. Traumatismo CrâNio-Encefálico: Abordagem Integrada. *Acta Med. Port.* **2012**, *25* (3), 179–192.

(34) Xiong, Y.; Mahmood, A.; Chopp, M. Emerging Treatments for Traumatic Brain Injury. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2009**, *14* (1), 67–84.

(35) Ghajar, J. Traumatic Brain Injury. *Lancet* **2000**, *356* (9233), 923–929.

(36) Dalton, P. D.; Mey, J. Neural Interactions with Materials. *Front. Biosci.* **2009**, *14* (2009), 769–795.

(37) Rosenfeld, J. V.; Maas, A. I.; Bragge, P.; Morganti-Kossmann, M. C.; Manley, G. T.; Gruen, R. L. Early Management of Severe Traumatic Brain Injury. *Lancet* **2012**,

*380* (9847), 1088–1098.

(38) McDonald, J. W.; Sadowsky, C. Spinal-Cord Injury. *Lancet* **2002**, *359*, 417–425.

(39) Skinner, J. *Exercise Testing and Exercise Prescription for Special Cases: Theoretical Basis and Clinical Application*, 3ª edição.; Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

(40) Fernandez, L.; Komatsu, D. E.; Gurevich, M.; Hurst, L. C. Emerging Strategies on Adjuvant Therapies for Nerve Recovery. *J. Hand Surg. Am.* **2018**, *43* (4), 368–373.

(41) Griffin, M.; Malahias, M.; Hindocha, S.; Wasim, K. S. Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair and Regeneration. *Open Orthop. J.* **2014**, *8*, 199–203.

(42) Lemos, I. A. F. Novas Estratégias No Tratamento De Lesões De Nervo Periférico, Universidade do Porto, 2015.

(43) Griffin, J. W.; Hogan, M. V; Chhabra, A. B.; Deal, D. N. Peripheral Nerve Repair and Reconstruction. *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* **2013**, *95* (23), 2144–2151.

(44) Amy CY Lo, F. S. Collagen-Based Scaffolds for Cell Therapies in the Injured Brain. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *05* (02).

(45) Cheng, T. Y.; Chen, M. H.; Chang, W. H.; Huang, M. Y.; Wang, T. W. Neural Stem Cells Encapsulated in a Functionalized Self-Assembling Peptide Hydrogel for Brain Tissue Engineering. *Biomaterials* **2013**, *34* (8), 2005–2016.

(46) Tam, R. Y.; Fuehrmann, T.; Mitrousis, N.; Shoichet, M. S. Regenerative Therapies for Central Nervous System Diseases: A Biomaterials Approach. *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 169–188.

(47) Grinsell, D.; Keating, C. P.; Grinsell, D.; Keating, C. P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 1–13.

(48) Habre, S.; Bond, G.; Jing, X. L.; Kostopoulos, E.; Wallace, R. D.; Konofaos, P. The Surgical Management of Nerve Gaps: Present and Future. *Ann. Plast. Surg.* **2018**, *80* (3), 252–261.

(49) Schmidt, C. E.; Leach, J. B. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, *5* (1), 293–347.

(50) Safa, B.; Buncke, G. Autograft Substitutes. Conduits and Processed Nerve Allografts. *Hand Clin.* **2016**, *32* (2), 127–140.

(51) Parra-cid, C.; Tiscareño-pérez, A.; Gómez-garcía, R. Biomateriales : Pieza Clave En La Reparación de Las Lesiones Medulares. *Investig. en Discapac.* **2014**, *3* (1), 25–32.

(52) Führmann, T.; Anandakumaran, P. N.; Shoichet, M. S. Combinatorial Therapies After Spinal Cord Injury: How Can Biomaterials Help? *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (10), 1–21.

(53) Heidari, M.; Bahrami, H.; Ranjbar-Mohammadi, M. Fabrication, Optimization and Characterization of Electrospun Poly(Caprolactone)/Gelatin/Graphene Nanofibrous Mats. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 218–229.

(54) Madigan, N. N.; McMahon, S.; O'Brien, T.; Yaszemski, M. J.; Windebank, A. J. Current Tissue Engineering and Novel Therapeutic Approaches to Axonal Regeneration Following Spinal Cord Injury Using Polymer Scaffolds. **2009**, *169*

(2), 183–199.

(55) Song, J.; Gao, H.; Zhu, G.; Cao, X.; Shi, X. The Preparation and Characterization of Polycaprolactone/Graphene Oxide Biocomposite Nanofiber Scaffolds and Their Application for Directing Cell Behaviors. *Carbon N. Y.* **2015**, *95*, 1039–1050.

(56) Stratton, S.; Shelke, N. B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S. G. Bioactive Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Bioact. Mater.* **2016**, *1* (2), 93–108.

(57) Gupta, D.; Venugopal, J.; Prabhakaran, M. P.; Dev, V. R. G.; Low, S.; Choon, A. T.; Ramakrishna, S. Aligned and Random Nanofibrous Substrate for the in Vitro Culture of Schwann Cells for Neural Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2560–2569.

(58) Ghasemi-Mobarakeh, L.; Prabhakaran, M. P.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M. H.; Ramakrishna, S. Electrospun Poly(ε-Caprolactone)/Gelatin Nanofibrous Scaffolds for Nerve Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (34), 4532–4539.

(59) Aldana, A. A.; Abraham, G. A. Current Advances in Electrospun Gelatin-Based Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Int. J. Pharm.* **2017**, *523*, 441–453.

(60) Tofoleanu, F.; Balau Mindru, T.; Brinza, F.; Sulitanu, N.; Sandu, I. G.; Raileanu, D.; Floristean, V.; Hagiu, B. A.; Ionescu, C.; Sandu, I.; et al. Electrospun Gelatin Nanofibers Functionalized with Silver Nanoparticles. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* **2008**, *10* (12), 3512–3516.

(61) Jin, G.; Prabhakaran, M. P.; Binoy, P.; Singh, G.; Kai, D.; Seeram; Ramakrishna. Electrospun Poly ( L-Lactic Acid ) -Co-Poly ( ϵ -Caprolactone ) Nanofibres Containing Silver Nanoparticles for Skin-Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2012**, *23* (18), 2337–2352.

(62) Das, S.; Sharma, M.; Saharia, D.; Sarma, K. K.; Sarma, M. G.; Borthakur, B. B.; Bora, U. Data in Support of in Vivo Studies of Silk Based Gold Nano-Composite Conduits for Functional Peripheral Nerve Regeneration. *Data Br.* **2015**, *4*, 315–321.

(63) Pham, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* **2006**, *2* (5), 1197–1211.

(64) Dias, J. R.; Reis, I.; Bártolo, P. J. *Potencial Do Electrospinning Para Aplicações Industriais*; Marinha Grande, 2016.

(65) Kishan, A. P.; Cosgriff-Hernandez, E. M. Recent Advancements in Electrospinning Design for Tissue Engineering Applications: A Review. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2017**, *105* (10), 2892–2905.

(66) Sill, T. J.; von Recum, H. A. Electrospinning: Applications in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 1989–2006.

(67) Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. Use of Electrospinning Technique for Biomedical Applications. *Polymer (Guildf).* **2008**, *49* (26), 5603–5621.

(68) Shah, S.; Yin, P. T.; Uehara, T. M.; Chueng, S.-T. D.; Yang, L.; Lee, K.-B. Guiding Stem Cell Differentiation into Oligodendrocytes Using Graphene-Nanofiber Hybrid Scaffolds. *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3673–3680.

(69) Wan, C.; Chen, B. Poly(ε-Caprolactone)/Graphene Oxide Biocomposites: Mechanical Properties and Bioactivity. *Biomed. Mater.* **2011**, *6* (5).

(70) Scaffaro, R.; Lopresti, F.; Maio, A.; Botta, L.; Rigogliuso, S.; Ghersi, G.

Electrospun PCL/GO-g-PEG Structures: Processing-Morphology-Properties Relationships. *Compos. Part A* **2017**, *92*, 97–107.

(71) Lopresti, F.; Maio, A.; Botta, L.; Scaffaro, R. Preparation and Mechanical Characterization of Polycaprolactone/Graphene Oxide Biocomposite Nanofibers. *AIP Conf. Proc.* **2016**, *1736*, 1–5.

(72) Nagarajan, S.; Pochat-Bohatier, C.; Teyssier, C.; Balme, S.; Miele, P.; Kalkura, N.; Cavaillès, V.; Bechelany, M. Design of Graphene Oxide/Gelatin Electrospun Nanocomposite Fibers for Tissue Engineering Applications. *RSC Adv.* **2016**, *6* (110), 109150–109156.

(73) Jalaja, K.; Sreehari, V. S.; Kumar, P. R. A.; Nirmala, R. J. Graphene Oxide Decorated Electrospun Gelatin Nanofibers: Fabrication, Properties and Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *64*, 11–19.

(74) Sherrell, P. C.; Thompson, B. C.; Wassei, J. K.; Gelmi, A. A.; Higgins, M. J.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G. Maintaining Cytocompatibility of Biopolymers through a Graphene Layer for Electrical Stimulation of Nerve Cells. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24*, 769–776.

(75) Ramazani, S.; Karimi, M. Aligned Poly(ε-Caprolactone)/Graphene Oxide and Reduced Graphene Oxide Nanocomposite Nanofibers: Morphological, Mechanical and Structural Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *56*, 325–334.

(76) Gonçalves, G.; Vila, M.; Bdikin, I.; De Andrés, A.; Emami, N.; Ferreira, R. A. S.; Carlos, L. D.; Grácio, J.; Marques, P. A. A. P. Breakdown into Nanoscale of Graphene Oxide: Confined Hot Spot Atomic Reduction and Fragmentation. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 1–8.

(77) Kovalevich, J.; Langford, D. Considerations for the Use of SH - SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In *Neuronal Cell Culture*; Humana Press, Totowa, NJ, 2013; Vol. 1078, pp 9–21.

(78) Uzarski, J. S.; DiVito, M. D.; Wertheim, J. A.; Miller, W. M. Essential Design Considerations for the Resazurin Reduction Assay to Noninvasively Quantify Cell Expansion within Perfused Extracellular Matrix Scaffolds. *Biomaterials* **2017**, *129*, 163–175.

(79) Completo, A.; Fonseca, F. Fundamentos de Biomecânica Músculo-Esquelética e Ortopédica; Publindústria, Edições Técnicas, 2011.

(80) Ramazani, S.; Karimi, M. Study the Molecular Structure of Poly(ε-Caprolactone)/Graphene Oxide and Graphene Nanocomposite Nanofibers. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *61*, 484–492.

(81) Patel, A.; Xue, Y.; Mukundan, S.; Rohan, L. C.; Sant, V.; Stolz, D. B.; Sant, S. Cell-Instructive Graphene-Containing Nanocomposites Induce Multinucleated Myotube Formation. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44* (6), 2036–2048.

(82) Girão, A. F.; Gonçalves, G.; Bhangra, K. S.; Phillips, J. B.; Knowles, J.; Irurueta, G.; Singh, M. K.; Bdkin, I.; Completo, A.; Marques, P. A. A. P. Electrostatic Self-Assembled Graphene Oxide-Collagen Scaffolds towards a Three-Dimensional Microenvironment for Biomimetic Applications. *RSC Adv.* **2016**, *6* (54), 49039–49051.

(83) Panda, D.; Nandi, A.; Datta, S. K.; Saha, H.; Majumdar, S. Selective Detection of Carbon Monoxide (CO) Gas by Reduced Graphene Oxide (RGO) at Room Temperature. *RSC Adv.* **2016**, *6* (53), 47337–47348.

(84) Xu, K.; Zhang, J.; Hao, X.; Zhang, C.; Wei, N.; Zhang, C. Wetting Properties of Defective Graphene Oxide: A Molecular Simulation Study. *Molecules* **2018**, *23* (6), 1–8.

(85) Jiao, X.; Qiu, Y.; Zhang, L.; Zhang, X. Comparison of the Characteristic Properties of Reduced Graphene Oxides Synthesized from Natural Graphites with Different Graphitization Degrees. *RSC Adv.* **2017**, *7* (82), 52337–52344.

(86) Ferreira, M. S. V.; Schneider, R. K.; Wagner, W.; Jahnen-Dechent, W.; Labude, N.; Bovi, M.; Piroth, D.; Knüchel, R.; Hieronymus, T.; Müller, A. M.; et al. Two-Dimensional Polymer-Based Cultures Expand Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem Cells and Support Engraftment of NSG Mice. *Tissue Eng. Part C Methods* **2013**, *19* (1), 25–38.

(87) Marote, A.; Barroca, N.; Vitorino, R.; M. Silva, R.; H.V. Fernandes, M.; M. Vilarinho, P.; A.B. da Cruz e Silva, O.; I. Vieira, S. A Proteomic Analysis of the Interactions between Poly(L-Lactic Acid) Nanofibers and SH-SY5Y Neuronal-like Cells. *AIMS Mol. Sci.* **2016**, *3* (4), 661–682.

(88) Da Rocha, J. F.; Da Cruz E Silva, O. A. B.; Vieira, S. I. Analysis of the Amyloid Precursor Protein Role in Neuritogenesis Reveals a Biphasic SH-SY5Y Neuronal Cell Differentiation Model. *J. Neurochem.* **2015**, *134* (2), 288–301.

# 7. Anexos

## 7.1. Anexo 1

**Esterilização das amostras**

Colocaram-se as amostras numa placa de cultura de 24 poços e encheu-se cada poço com 2 mL de água destilada; repetiu-se o processo passados 30 e 90 minutos. Uma hora depois, substituiu-se a água destilada por H2O:CH3CH2OH (50:50) e deixou-se atuar durante uma hora. Passado esse tempo substituiu-se por etanol 70% e deixou-se atuar durante três horas. Removeu-se a solução anterior e colocou-se PBS:CH3CH2OH (50:50) durante a noite. No dia seguinte, fizeram-se duas lavagens com PBS com uma hora de intervalo.

## 7.2. Anexo 2

**Protocolo de imunocitoquímica**

1. Colocaram-se 500 µL de Triton 0,2% em PBS em cada poço;
2. Passados dez minutos lavou-se com PBS;
3. Incubou-se com Alexa Fluor™ 568 Phalloidin (Life Technologies, A12380) (1:50, diluído em PBS com 1% BSA) durante uma hora à temperatura ambiente;
4. Fizeram-se três lavagens com PBS com cinco minutos de intervalo;
5. Seguiu-se a marcação do núcleo com Hoechst (1:2000);
6. Passados cinco minutos fizeram-se três lavagens com PBS, de cinco minutos cada;
7. Montaram-se as amostras na lâmina com meio de montagem (Mowiol). A fase com as células ficou virada para a lâmina. Absorveu-se o excesso de meio de montagem com papel absorvente e deixou-se secar.

## 7.3. Anexo 3

**Desidratação e secagem das amostras**

1. Lavaram-se as amostras com PBS três vezes;
2. Substituiu-se o PBS por uma solução de etanol a 40% e deixou-se atuar por 10 minutos;

3. Repetiu-se o processo com soluções de etanol de 70%, 90% e 100%;
4. Transferiram-se as amostras para uma solução HMDS:100% de etanol (1: 2) e deixou-se por 20 min;
5. Substitui-se por uma solução de HMDS: 100% de etanol (2:1);
6. Passados 20 minutos, colocou-se 100% HMDS e deixou-se a secar durante a noite.

## 7.4. Anexo 4

**Apresentações em formato poster**

A qualidade e inovação do trabalho descrito nesta dissertação já teve reconhecimento da comunidade científica a partir de três comunicações em formato poster apresentadas em congressos nacionais e internacionais:

**Poster 1**: Poster intitulado "Biomimetic engineering of a graphene composite scaffold for repairing the injured spinal cord" apresentado na 1ª Conferência Tema Investigação realizada na Universidade de Aveiro em junho de 2018.

Lista de autores: André F. Girão, Joana Sousa, María C. Serrano, António Completo e Paula A.A.P. Marques

**Poster 2**: Poster intitulado "Polycaprolactone-gelatin-graphene oxide electrospun nanofibers for tissue engineering applications" apresentado na *International Conference on Nanomaterials Science and Mechanical Engineering* realizada na Universidade de Aveiro em julho de 2018.

Lista de autores: Joana Sousa, André F. Girão, Sandra I. Vieira e Paula A.A.P. Marques.

**Poster 3**: Poster intitulado "A biomimetic tissue engineering scaffold for repairing the injured spinal cord: proof of concept" apresentado na *International Conference on Nanomaterials Science and Mechanical Engineering* realizada na Universidade de Aveiro em julho de 2018.

Lista de autores: André F. Girão, Joana Sousa, María C. Serrano, António Completo e Paula A.A.P. Marques

1ª Conferência TEMA Investigação

# Biomimetic engineering of a graphene composite scaffold for repairing the injured spinal cord

André F. Girão[1,2*], Joana Sousa[1], María C. Serrano[2], António Completo[1] and Paula A.A.P. Marques[1]

[1]TEMA, Department of Mechanical Engineering, University of Aveiro, Portugal

[2]Insituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

***andrefgirao@ua.pt**

## Abstract

Tissue engineering (TE) scaffolds are a very promising approach to assist the currently inefficient palliative and rehabilitation spinal cord injury (SCI) treatments by enabling the recreation of the complex spinal cord microenvironment and consequently the recovery of the lost functionality. Thus, in this work, we propose a 3D TE scaffold able to provide two distinctive zones with complementary porous and fibrous topographies, mimicking the morphology of the grey and white matters, respectively. Preliminary results showed that both components present morphologies that match their native counterparts as well as chemical and mechanical properties capable of enhancing the cell response.

## Introduction

SCI is a traumatic pathology that commonly brings lifetime social and physiological disabilities for patients worldwide. Indeed, the loss of autonomic, motor and/or sensory functions below the injury site is usually permanent due to the very reduced ability of the central neural tissue to regenerate after damage, which is unable to prevent the enduring disruption of the nervous signaling pathways between the brain and the peripheral effectors. Thus, in recent years, TE is combining biomaterials, nanofabrication techniques and cell therapies with the purpose of fabricating biomimetic scaffolds capable of providing bioactive features to modulate cell responses towards a complete anatomical and physiological regeneration of the injured area [1]. Some groundbreaking advances in this field deeply rely on the presence of graphene [2], which displays electrical, chemical and mechanical properties suitable for an optimized cell response in neural TE applications. Thus, in this work we propose **a 3D scaffold capable of, not only accurately mimicking the complex architecture of the spinal cord, but also boosting the graphene characteristics on the way to modulate cell-material interactions.**

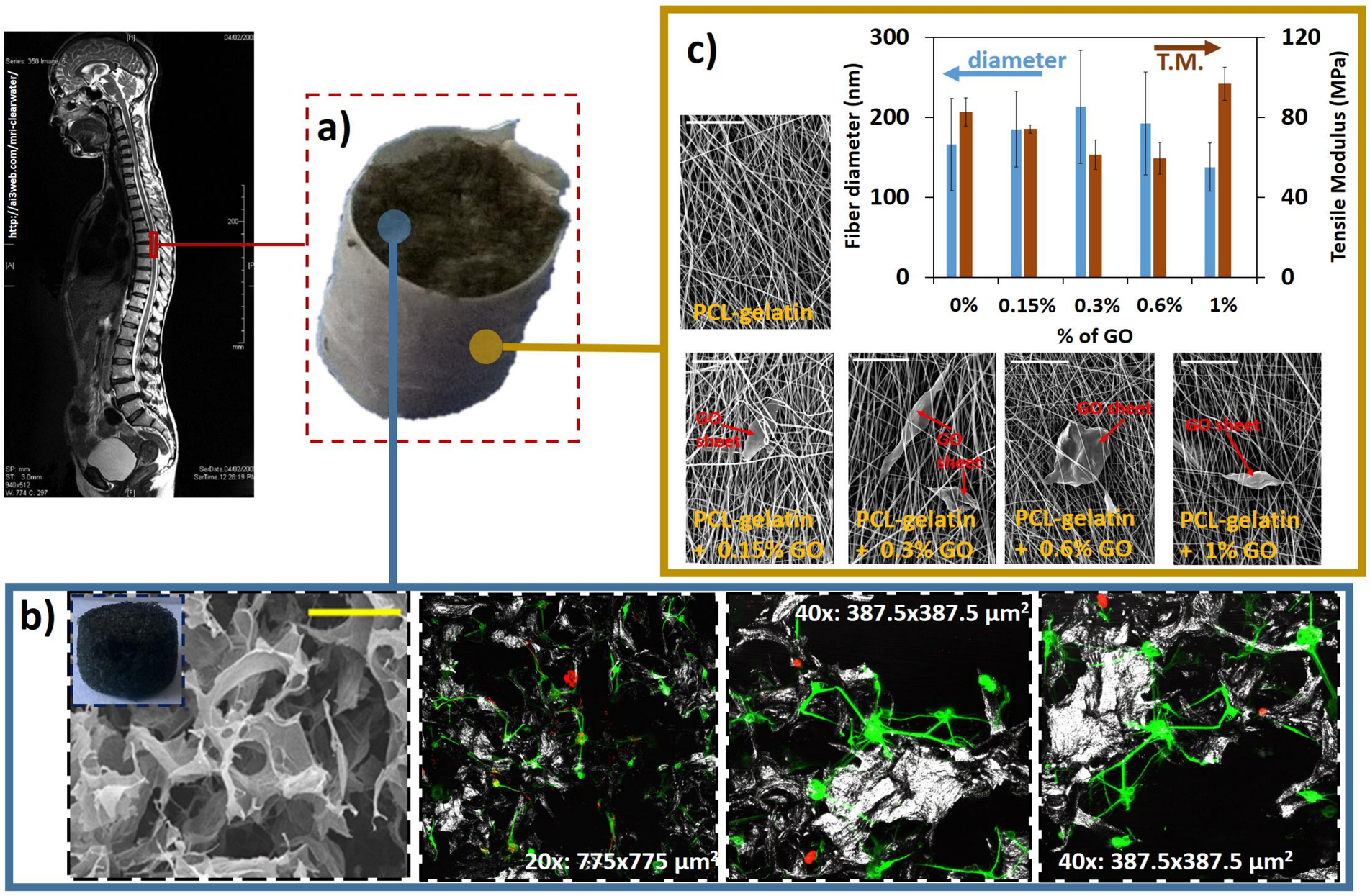



**Fig.1.** Biomimetic design of a graphene composite scaffold for the regeneration of the spinal cord. **a)** Preliminary concept of the scaffold with a rGO-collagen microporous network surrounded by vertically aligned PCL-gelatin-GO electrospun fibers; **b)** rGO-collagen scaffold: morphological characterization (left image) and cell-material interactions using ENPCs to test the differentiation process into neurons (Map-2: green fluorescence) and glial cells (Vimetin: red fluorescence) after 7 days of culture; **c)** PCL-gelatin-GO electrospun fibers: mechanical and morphological analysis of the electrospun fibers (**electrospinning parameters**: 10% w/v in THF; 30 kV of voltage; 15 cm of working distance, 1.5 mL/h of flow rate and 1500 RPM) after adding different percentages of GO into the initial PCL-gelatin composite. **Scale bars**: 150 µm (b, yellow) and 10 µm (c, white).

## Preliminary Results and Discussion

The concept for the **3D scaffold herein presented includes two distinctive zones with complementary porous and fibrous topographies able to mimic the morphology of the grey and white matters**, respectively (Fig.1a). Briefly, the reduced graphene oxide – collagen (rGO-collagen) porous system occupies the core of the scaffold and its fabrication was based in previous reports [3]. Preliminary biocompatibility tests showed that this rGO-collagen microporous network embraces a set of biochemical, mechanical and morphological features able to enhance the differentiation of embryonic neural progenitor cells (ENPCs) preferentially into neurons (Fig. 1b). Complementary, a Polycaprolactone-gelatin-graphene oxide (PCL-gelatin-GO) nanofibrous network was electrospun in order to surround the porous structure and consequently be able to guide the axons onto ascendant and descendent pathways, similarly to the white matter of the spinal cord. The mechanical and topographic analysis of the electrospun mesh (Fig. 1c) confirmed that, independently of the percentage of GO added (0.15%, 0.3%; 0.6% and 1%), the PCL-gelatin-GO nanofibres presented both diameter and tensile modulus compatible with neural TE protocols [4]. **Future studies will include the optimization of the conductive properties of the scaffold since an enhanced electrical conductivity could lead not only to better cell adhesion, proliferation and differentiation, but also to the introduction of different electrical stimulation patterns able to modulate the cell response** [5].

## References

[1] Fuhrmann et al., Adv. Healthc. Mater, vol.6, 1601130, 2017.

[2] Akhavan et al., J. Mater. Chem. B., vol.4, 3169-3190, 2016.

[3] Girão et al., RSC Adv., vol.6, 49039-49051, 2016.

[4] Mobarakeh et al., Biomaterials, vol.29, 4532-4539, 2008.

[5] Li et al., Sci. Rep., vol.3, 1604, 2013.

## Acknowledgments

The authors thank to FCT for the PhD grant SFRH/BD/130287/2017 and IF/00917/2013/CP1162/CT0016.

Also to TEMA (UID/EMS/00481/2013).

**Com o apoio dos projetos:**
UID/EMS/00481/2013 - FCT
CENTRO-01-0145-FEDER-022083

universidade de aveiro
theoria poiesis praxis

dem
departamento de engenharia mecânica

tema
centro de tecnologia mecânica e automação

university of aveiro tema centre for mechanical technology and automation

# Polycaprolactone-gelatin-graphene oxide electrospun nanofibers for tissue engineering applications

**Joana Sousa*[1,2], André F. Girão[1], Sandra I. Vieira[2] and Paula A.A.P. Marques[1]**

[1] Centre for Mechanical Technology and Automation (TEMA), Mechanical Engineering Department, University of Aveiro, Portugal
[2] Institute of Biomedicine (iBiMED) and Centre for Cell Biology (CBC), Department of Medical Sciences, University of Aveiro, Portugal
*joanapmsousa@ua.pt

## Objective:

Due to the deficient natural regeneration processes of the central and peripheral nervous systems, TE has emerged as a promising approach to attenuate the traumatic effects induced by the lost of anatomical and physiological functions after injury.

In this work, we fabricated a wide range of composite electrospun PCL-gelatin-GO scaffolds to study the influence of concentration, size and reduction level of GO on the mechanical and morphological properties of the fibers with the final purpose of identifying the best compositions to be included in future neural cell culture protocols involving electrical stimulation.

## Abbreviations

| | |
|---|---|
| **$\varepsilon_b$** | Elongation at break |
| **E** | Young's modulus |
| **GO** | Graphene oxide |
| **nGO** | Nano graphene oxide |
| **nrGO** | Nanoreduced graphene oxide |
| **PCL** | Polycaprolactone |
| **rGO** | Reduced graphene oxide |
| **TE** | Tissue Engineering |
| **UTS** | Ultimate tensile strength |

## References:

[1] Patel et al., Annals of Biomedical Engineering, **44**, 2016

[2] Scaffaro et al., Composites: Part A, **92,** 2017

## Acknowledgments:

The authors would like to thank to FCT for the PhD grant SFRH/BD/130287/2017 and for the project IF/00917/2013/CP1162/CT0016 and to TEMA (UID/EMS/00481/2013 and CENTRO-01-0145-FEDER-022083).

Cofinanciado por:

COMPETE 2020 PORTUGAL 2020

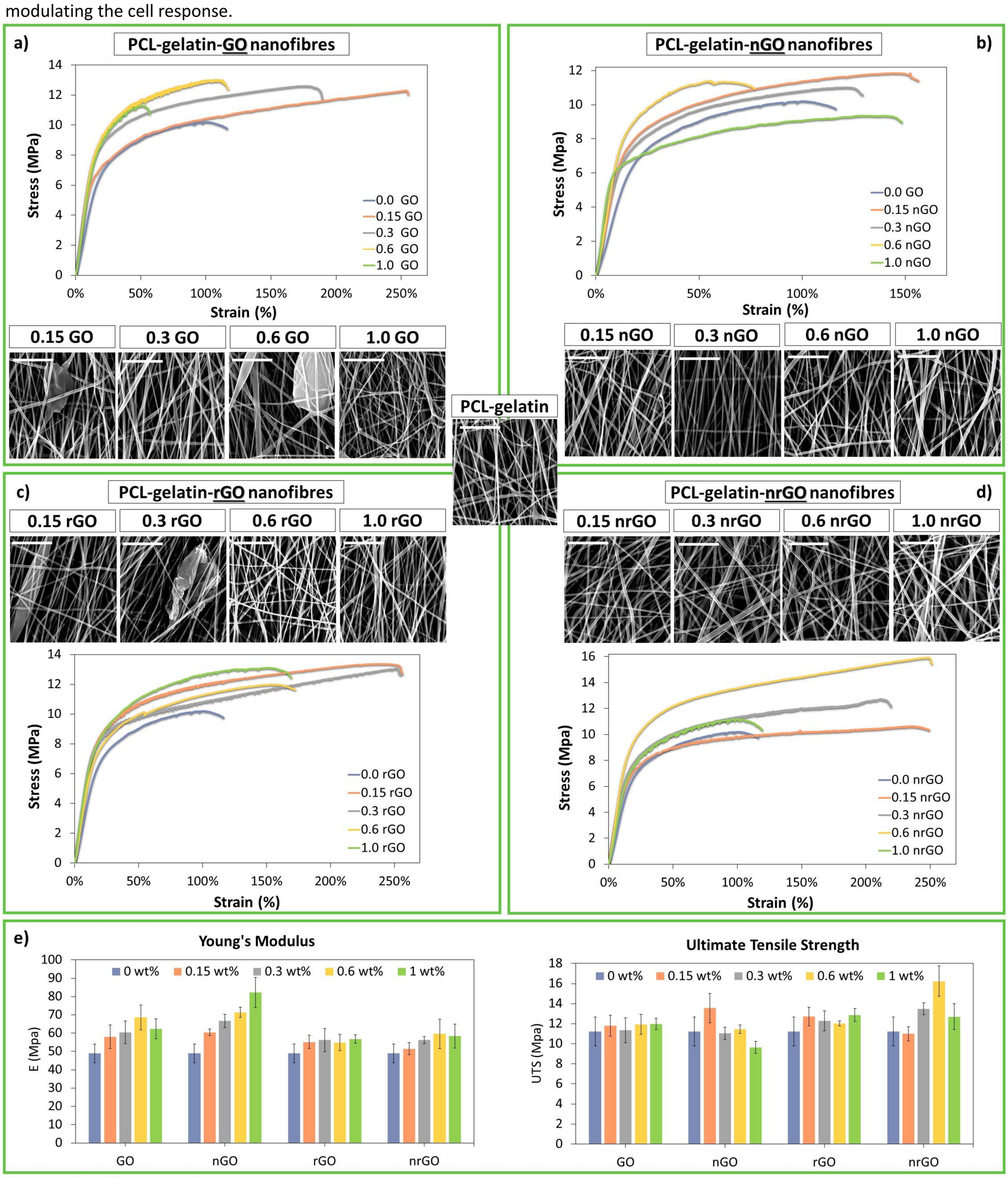
UNIÃO EUROPEIA Fundo de Coesão FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

**International Conference on Nanomaterials Science and Mechanical Engineering**

**University of Aveiro, Portugal, July 16-18, 2018**

**Results and discussion:** SEM images of the nanocomposite electrospun scaffolds show interconnected pore structures, aligned orientations of fibres, smooth fibre morphologies and similar average fibre diameters (between 152,34 nm ± 50,33 and 207,41 nm ± 58,00 nm) regardless the % of added GO, nGO, rGO and rnGO (GO and rGO sheets: 787,25 nm; nGO and nrGO sheets: 65,93 nm) [1]. The nanocomposites with GO and nGO (**Figures 1a** and **b**) are more rigid (higher E) than the ones with rGO e nrGO (**Figure 1c** and **d**), but less deformable i.e. the failure occurs prematurely for the fibres containing both types of GO thus showing smaller UTS and $\varepsilon_b$ [2]. This is probably due to the greater amount of hydrogen bonds established between the GO sheets and PCL-gelatin, providing a better dispersion of the filler in the polymer matrix. Contrarily, in the fibres with rGO and rnGO, the E value does not undergo significant variations (**Figure 1e**). On the other hand, the UTS and $\varepsilon_b$ change with filler concentration: for example, these values were enhanced respectively by 46% and 13% with the addition of 0.6 wt% nrGO nanosheets, however at higher loadings, the distance between the nanosheets became smaller and their consequent agglomeration acted as weak points leading to easy breakage of the electrospun meshes – lower UTS and $\varepsilon_b$.

Taking these results into account, all the electrospun scaffolds present mechanical and morphological features compatible with cell culture protocols involving neural TE. So, before the selection of the best candidates for biocompatibility analysis, future studies will include conductivity tests in order to evaluate which scaffold is more suitable to conduct electrical patterns capable of modulating the cell response.




*w/w % relatively to PCL-Gelatin

**Figure 1 –** Mechanical and morphological analysis of the electrospun scaffolds. **a)**, **b)**, **c)** and **d)** SEM images and stress-strain curves of PCL-gelatin nanofibres with different concentrations of GO, nGO, rGO and nrGO. Scale: 5 µm. **e)** Young's modulus and ultimate tensile strength values depending on the concentration and type of added GO.

university of aveiro tema centre for mechanical technology and automation

# A biomimetic tissue engineering scaffold for repairing the injured spinal cord: proof of concept

**André F. Girão[1,2*], Joana Sousa[1], María C. Serrano[2], António Completo[1] and Paula A.A.P. Marques[1]**

[1] Centre for Mechanical Technology and Automation (TEMA), Mechanical Engineering Department, University of Aveiro, Portugal

[2] Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

*andrefgirao@ua.pt

## Objective:

Considering the evident limitations of available medical treatments to overcome the deficiencies of the natural regeneration process of the spinal cord, complex biomedical strategies combining drug delivery with advanced scaffolds capable of enhancing the cell response are being developed with promising results in minimizing the traumatic spinal cord injury (SCI) effects [1]. In this work we propose a methodology to fabricate a 3D tissue engineering (TE) scaffold able to provide two complementary porous and fibrous microenvironments with the purpose of recreating *in vitro* the morphology and functionality of the grey and white matters, respectively.

## Results and discussion:

The scaffold concept is summarized in Figure 1a, where it is possible to see a fabrication process that involves the production of an electrospun polycaprolactone-gelatin-graphene (PCL-gelatin-graphene) nanofibrous network capable of surrounding a biocompatible graphene oxide-collagen (GO-collagen) microporous system, which resulted from the freeze-drying of a self-assembled GO-collagen hydrogel [2]. In this way, it is possible to conceive an area able to support the somata of the neurons (porous morphology – grey matter) and a complementary region (fibrous morphology – white matter) where the axons will be guided onto ascendant and descendent pathways. Preliminary biocompatibility results (Figure 1b) conducted on the porous system after a chemical reduction process (rGO-collagen) showed that its set of biochemical, electrical, mechanical and topographical features were suitable to enhance the preferential differentiation of embryonic neural progenitor cells (ENPCs) into neurons. Additionally, the composite PCL-gelatin-graphene electrospun nanofibres presented mechanical and topographical properties suitable for neural TE applications [3]. Future studies will not only include the analysis of the cell response in the fibrous/porous scaffold, but also the boosting of the graphene characteristics and consequently the optimization of the cell-material interactions by introducing electrical stimulation patterns able to modulate the cell behaviour [4,5].

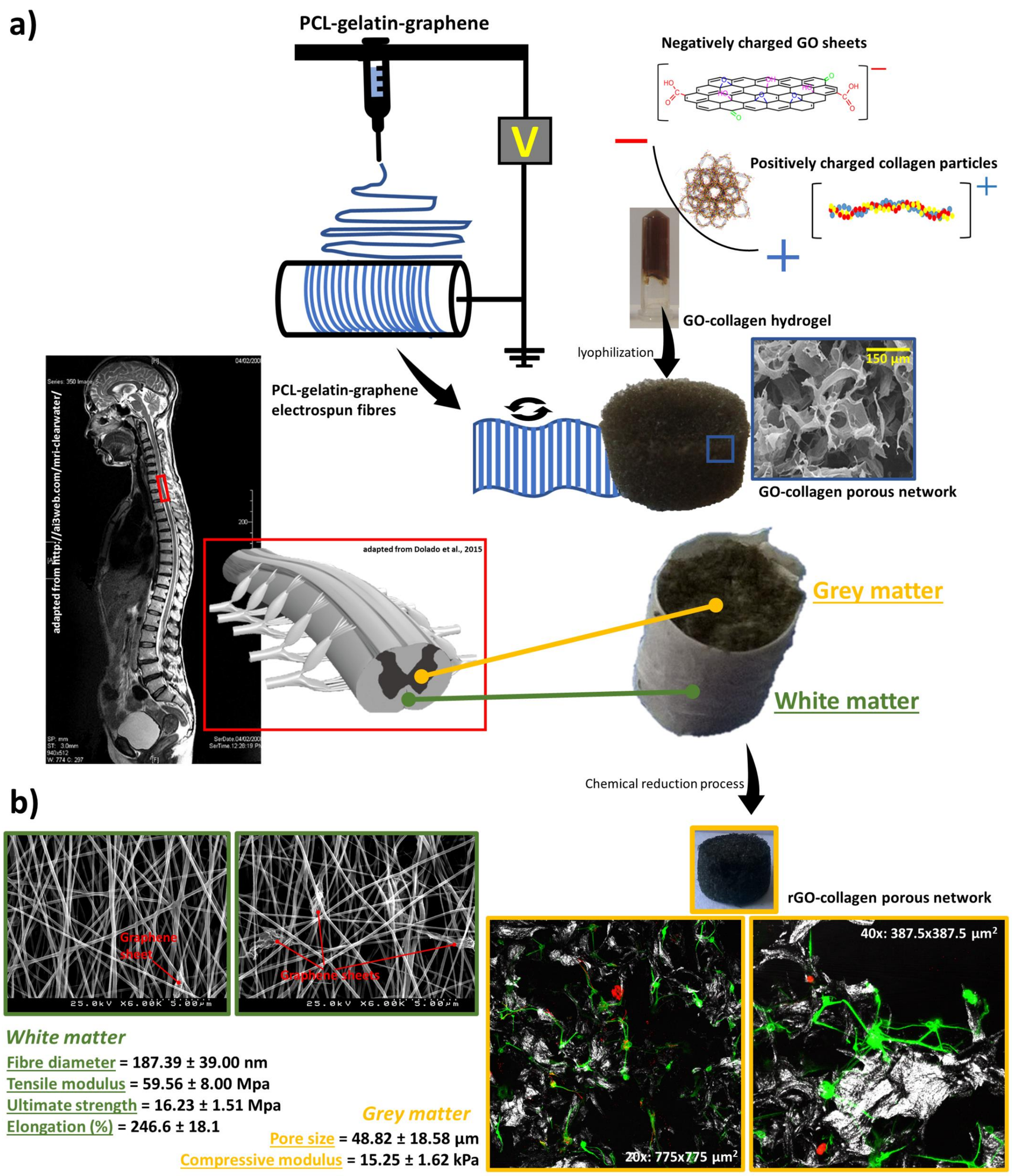



**Figure 1:** 3D fibrous/porous scaffold for repairing the injured spinal cord. **a)** Proof of concept; **b)** preliminary results of the individual regions: rGO-collagen porous system - cell-material interactions using ENPCs to test the differentiation process into neurons (Map-2: green fluorescence) and glial cells (Vimentin: red fluorescence) after 7 days of culture. PCL-gelatin-graphene electrospun fibres: mechanical and morphological analysis (electrospinning parameters: 10% w/v in THF with 1:1 (w:w) PCL:gelatin ratio and 0.6% w/w of rGO relatively to PCL; 30 kV of voltage; 15cm of working distance, 1.5mL/h of flow rate and 1500RPM).

## References:

[1] Fuhrmann et al., Adv. Healthc. Mater, 6, 1601130, (2017)

[2] Girão et al., RSC Adv., 6, 49039-49051, (2016)

[3] Mobarakeh et al., Biomaterials, 29, 4532-4539, (2008)

[4] Akhavanetal et al., J. Mater. Chem. B., 4, 3169-3190, (2016).

[5] Li et al., Sci.Rep., 3, 1604, (2013).

## Acknowledgments:

The authors would like to thank to FCT for the PhD grant SFRH/BD/130287/2017 and for the project IF/00917/2013/CP1162/CT0016 and to TEMA (UID/EMS/00481/2013 and CENTRO-01-0145-FEDER-022083).

Cofinanciado por: COMPETE 2020 PORTUGAL 2020 UNIÃO EUROPEIA Fundo de Coesão FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia

**International Conference on Nanomaterials Science and Mechanical Engineering**
**University of Aveiro, Portugal, July 16-18, 2018**