

DESAFIOS NO DESENVOLVIMENTO DE ENXERTOS VASCULARES A PARTIR DA TÉCNICA DE ELETROFIAÇÃO

Geovany Candido Karen Galvão

3D Biotechnology Solutions – 3DBS, BRAZIL, ogeovanycandido@gmail.com

Hamilton Angelo Oriente

3D Biotechnology Solutions – 3DBS, BRAZIL, orienteha@gmail.com;

Pedro Xavier Rodriguez Massaguer

3D Biotechnology Solutions– 3DBS, BRAZIL, pedroxrm@gmail.com;

Marcelo Napimoga

Faculdade São Leopoldo Mandic Campinas, BRAZIL, mgo@unicamp.br;

Ana Luiza Garcia Massaguer Millás

3D Biotechnology Solutions– 3DBS, BRAZIL, Bioanaluizamillas@gmail.com

INTRODUÇÃO

A biofabricação de estruturas tubulares, como alternativa aos enxertos autólogos, tem sido amplamente estudada pelo campo da engenharia de tecidos, que utiliza como ferramentas as tecnologias de eletrofição e de bioimpressão 3D. O objetivo desta pesquisa é fabricar e caracterizar estruturas tubulares eletrofiadas, visando a aplicação futura como enxertos vasculares celularizados associando a técnica de bioimpressão 3D.

As matrizes eletrofiadas com diferentes características estruturais, como diâmetro de filamento, espessura e grau de ordenamento das fibras, estão sendo utilizadas como base mecânica e estrutural receptora de células carregadas em biotintas e/ou meio de cultura, e depositadas a partir da tecnologia de bioimpressão 3D. Esse sistema híbrido associa dois equipamentos: o Electrospinning Starter™ e a bioimpressora Gênese™ - ambos desenvolvidos pela 3DBS. Os dois compartilham um mesmo eixo rotativo intercambiável.

Em relação às estruturas tubulares celularizadas, um dos maiores desafios é a infiltração e a proliferação celular nos scaffolds, sendo o diâmetro dos filamentos e o tamanho de poros, determinantes (Han et al., 2019). As malhas confeccionadas precisam ser compatíveis com os diferentes tipos celulares, comportamento, função e fisiologia celular (Millás, 2016, Xingmao et al., 2019). As estruturas tubulares bicamada (bilayers), com nanofibras aleatórias na camada interna (lúmen) e microfibras ordenadas/alinhadas na camada externa, tem sido uma abordagem interessante na fabricação de enxertos vasculares (Ju et al, 2017; Han et al., 2019). No campo da biomimética é interessante que a morfologia das camadas reconstruídas se assemelhe a morfologia in vivo dos vasos nativos, chegando mais próximo das suas funções e estética.

Muitos polímeros sintéticos, como a policaprolactona (PCL) e o poli(ácido Láctico-L- láctico) PLLA, possuem características hidrofóbicas (PIRES et al., 2015), o que dificulta a infiltração celular e a biointegração das biotintas aos scaffold fibrosos. Liu e colaboradores (2020) utilizaram fibras de PLLA funcionalizadas com gelatina, sobre as quais cultivavam EC's e SMC's para reconstrução uretral. O trabalho comparou a infiltração e a proliferação celulares em diferentes

concentrações de PLLA e gelatina. O melhor resultado foi obtido com a concentração de 3:1 (PLLA/gelatina).

Sendo assim o objetivo é fabricar um scaffold bilayer de PLLA/Gelatina (3:1), com uma camada interna de nanofibras aleatórias para o cultivo de células endoteliais (ECs), mimetizando a túnica íntima, e uma camada externa de microfibras alinhadas para o crescimento de células musculares lisas (SMCs), mimetizando a túnica média.

No entanto, a fabricação de *scaffolds bilayer* tubulares com diâmetros abaixo de 6 mm ainda é um desafio, tanto do ponto de vista dos parâmetros usados na tecnologia de eletrofiação, quanto da semeadura de células nessas estruturas.

METODOLOGIA

Materiais. Poli(ácido-L-lactico) (PLLA) (Purac/Corbion), Gelatin from bovin skin (Sigma-Aldrich - G9391) e Hexafluoroisopropanol (HFIP) (Sigma-Aldrich – 101991570).

Eletrofiação dos grupos amostrais. O experimento foi dividido em 4 grupos, sendo: (a) Membranas monocamada; (b) Membrana bicamada; (c) Tubos monocamada; e (d) Tubos bicamada.

Grupo (a). foram eletrofiadas quatro fibras, sendo: controles, PLLA 10% (p/p) (P10) e PLLA 20% (p/p) (P20) dissolvidos em HFIP; e funcionalizadas, PLLA/Gelatina (3:1) 10% (p/p) (P/G10) e PLLA/Gelatina(3:1) 20% (p/p) (P/G20) dissolvidos em HFIP. A tensão aplicada foi, respectivamente, de 16 kV, 18 kV, 13 kV e 22 kV. Todas as amostras foram fabricadas utilizando uma agulha 22G, a 14 cm do coletor, com um avanço de 5mm/h, em um coletor de 90mm de diâmetro, a 2K RPM. As soluções das amostras P/G10 e P/G20 foram mantidas a 50°C durante o processo de eletrofiação.

Grupo (b). Fibra bicamada de PLLA/Gelatina (3:1) (7,5% e 15%) HFIP. A camada interna foi fabricada utilizando uma agulha 25G, a 18 cm do coletor, com um avanço de 1mm/h, a 600 RPM, com uma tensão de 12,5 kV. Já na camada externa foi utilizada uma agulha 21G, a 16 cm do coletor, com um avanço de 2mm/h, a 2K RPM, com uma tensão de 13,8 kV. A fibra foi eletrofiada em um coletor de 90mm de diâmetro e as soluções para as camadas internas e externas foram mantidas durante o processo a, respectivamente, 50°C e 45°C.

Grupo (c). Foram eletrofiadas 3 fibras de PLLA/Gelatina(3:1) 7,5% HFIP (p/p) e 3 fibras de PLLA/Gelatina(3:1) 15% HFIP (p/p), que permaneceram em um agitador magnético, a 50°C, durante 3 dias. Para as fibras geradas da solução de 7,5% foi utilizado uma agulha 22G, a 18 cm do coletor e uma rotação de 1K RPM, enquanto que as fibras de 15% foram eletrofiadas com uma agulha 18G, a 16 cm do coletor e rotação de 5K RPM. Todas as fibras foram fabricadas em um coletor com 6 mm de diâmetro, com um avanço de 20mm/h, tensão de 13,3 kV e temperatura de 50°C durante o processo.

Grupo (d). Foram eletrofiadas 3 fibras bicamada de PLLA (7,5% e 15%) HFIP e 3 fibras bicamada de PLLA/Gelatina (3:1) (7,5% e 15%) HFIP. A camada interna dessas fibras (soluções de 7,5%) foi fabricada utilizando uma agulha 25G, a 18 cm do coletor, com um avanço de 3mm/h, a 1K RPM, com uma tensão de 12,5 kV. Já na camada externa (soluções de 15%) foi utilizada uma agulha 22G, a 16 cm do coletor, com um avanço de 6mm/h, a 6K RPM, com uma tensão de 13 kV. Todas as fibras foram fabricadas em um coletor com 6mm de diâmetro.

Caracterização morfológica das fibras. As amostras foram enviadas para análise em MEV no LRAC/UNICAMP (Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração). Os diâmetros das fibras e os diâmetros dos poros foram analisados utilizando o *software ImageJ*, selecionando 40 pontos (diâmetro ou poro) e duas fotos por amostra. A orientação das fibras foi analisada no mesmo software utilizando o plugin *Orientation J* (Connor, Cahill, & Mcguinness, 2021).

Caracterização Histológica. Foram semeadas EC's e SMC's nas amostras dos grupos (a) e (c) e, posteriormente, caracterizadas histologicamente com coloração e corte H&E. Na amostra (a) também foi realizada a técnica de imunofluorescência com DAPI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização das fibras eletrofiadas indicou, não só a relação entre diâmetro de fibra e tamanho de poro, como também o quanto estas características são afetadas pela alteração de parâmetros de processo e solução, tanto em membranas quanto em estruturas tubulares, o que corrobora com os resultados obtidos na tese da pesquisadora Millás (2016).

Em relação ao diâmetro das fibras e tamanho dos poros, os *scaffolds* de PLLA/Gelatina com maior concentração de polímero (15% p/p e 20% p/p) obtiveram um desvio padrão significativamente maior em relação aos *scaffolds* com menor concentração (7,5% p/p e 10% p/p). Além disso, *scaffolds* fabricados com diferentes agulhas (18G, 21G e 22G) e com maior concentração de PLLA/Gelatina apresentaram valores próximos da média de diâmetro de fibra (13,18 μm , 11,93 μm e 13,96 μm). No entanto, a média do diâmetro das fibras na camada externa PLLA 15% p/p dos tubos bicamada foi de 1,03 μm , enquanto a mesma camada em tubos de PLLA/Gelatina 15% p/p obteve uma média de diâmetro de fibra de 13,96 μm . Os *scaffolds* de PLLA com menor concentração de polímero, fabricados com baixas velocidades de infusão (5mm/h (a) e 1mm/h (d)) tiveram a média do diâmetro da fibra abaixo de 1 μm (P10 = 0,7 μm ; P20 = 0,33 μm (a); e tubo bicamada = 0,68 μm (d)) independente da agulha utilizada (22G ou 25G, respectivamente). No entanto, a fibra de PLLA/Gelatina do grupo (b) (25G a 1mm/h) teve uma média de diâmetro de 1,02 μm . A incorporação de gelatina parece ter influência não só na variação do diâmetro das fibras, como também no diâmetro médio delas.

A análise de orientação revelou coerência acima de 50% para membranas fabricadas com velocidade de 2000 RPM (exceto para P/G20(a)) e para tubos fabricados com velocidade de 5000 RPM. Os tubos fabricados com velocidade de 6000 RPM apresentaram baixa coerência.

Foram realizados testes *in vitro* de citocompatibilidade com as fibras do grupo (a) e com os tubos do grupo (c), utilizando células endoteliais (EC's) e células musculares lisas (SMC's). As imagens panorâmicas com coloração de hematoxilina/eosina (HE) mostram a morfologia das células endoteliais e das células musculares lisas. Nota-se uma grande densidade de proliferação de EC's, tanto na fibra de PLLA, quanto na fibra funcionalizada (PLLA/Gelatina). Por outro lado, observa-se mais densidade de SMC's na fibra controle do que na fibra funcionalizada.

O ensaio de imunofluorescência com DAPI mostrou maior densidade celular nas duas fibras controle e menor, nas fibras funcionalizadas. Nos cortes histológicos, as fibras controle não foram coradas e suas células alojaram-se superficialmente; enquanto que

as fibras funcionalizadas foram coradas e as células tiveram infiltração na matriz, o que indica o sucesso na funcionalização da fibra.

Tratando-se dos tubos eletrofiados, a coloração panorâmica revelou células nas superfícies de duas das três amostras de 7,5% p/p, enquanto que os cortes HE indicaram ausência de células infiltradas em todos os tubos. Todavia, observou-se células nas biotintas, o que evidencia a sua permanência no hidrogel e não infiltração celular nas matrizes fibrosas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de eletrofiação é poderosa e possibilita criar membranas e tubos com diferentes arquiteturas para serem aplicadas na engenharia de tecidos. Pra isso é necessário tempo e dedicação para entender a influência de cada parâmetro de processo, solução e ambiente no resultado final. Fabricar um tubo bicamada, com a camada interna nano e aleatória e a externa micro e alinhada, em um coletor de 6 mm de diâmetro e com replicabilidade, ainda é um desafio.

Isto posto e considerando o objetivo exposto, relacionado a adesão de EC's na superfície do lúmen e a infiltração de SMC's a partir da superfície externa das estruturas tubulares, os objetivos foram parcialmente atingidos. De acordo com Han (2019) e colaboradores a infiltração celular é proporcional ao diâmetro da fibra, enquanto a proliferação é inversamente proporcional. Segundo esses autores, fibras com diâmetro entre 7 e 10 μm possibilitam boa infiltração e proliferação. Suspeitamos que as fibras do grupo (c), com diâmetro médio acima de 13 μm , possivelmente impediram a proliferação de SMC's, enquanto que as fibras do grupo (a), com diâmetros abaixo de 2 μm impossibilitaram uma boa infiltração. Além disso, a permanência de SMC's nas biotintas, nos leva a suspeitar que o sentido da infiltração perpendicular ao sentido de decantação, influenciou a não infiltração celular nas matrizes.

Os resultados dos grupos (a) mostraram que é possível fabricar fibras com diâmetros abaixo de 0,5 μm , enquanto que os resultados do grupo (c) mostraram que é possível alinhar fibras em coletores com 6mm de diâmetro. Sendo esses os dois maiores desafios relacionados a morfologia da fibra, fabricar fibras nano e fibras

alinhas em coletores de baixo diâmetro, a próxima etapa é refazer as membranas e tubos bicamada utilizando os parâmetros otimizados resultantes dessa pesquisa, mirando em fibras com diâmetro abaixo de 0,5 μm para a camada interna e entre 7 e 10 μm para a camada externa. Processos funcionalizados com Gelatina ainda são incertos e demandam maior aprofundamento na literatura.

AGRADECIMENTOS:

À FAPESP/PIPE-FASE-2. Ao Hub de Inovação em Saúde da Faculdade São Leopoldo Mandic de Campinas/SP onde a startup 3D Biotechnology Solutions está incubada.

Palavras-chave: *electrospinning*, estruturas tubulares,

REFERÊNCIAS

Han, D. G., Ahn, C. B., Lee, J., Hwang, Y., Kim, J. H., Park, K. Y., ... Son, K. H. (2019). Optimization of Electrospun Poly(caprolactone) Fiber Diameter for Vascular Scaffolds to Maximize Smooth Muscle Cell Infiltration and Phenotype Modulation. <https://doi.org/10.3390/polym11040643>

Ju, Y. M., Ahn, H., Arenas-herrera, J., Kim, C., Abolbashari, M., Atala, A., ... Lee, S. J. (2017). Acta Biomaterialia Electrospun vascular scaffold for cellularized small diameter blood vessels : A preclinical large animal study. *Acta Biomaterialia*, 59, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.027>

Liu, G., Fu, M., Li, F., Fu, W., Zhao, Z., Xia, H., & Niu, Y. (2020). Materials Science & Engineering C Tissue-engineered PLLA / gelatine nano fibrous scaffold promoting the phenotypic expression of epithelial and smooth muscle cells for urethral reconstruction. *Materials Science & Engineering C*, 111(March), 110810. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110810>

MILLÁS, ANA LUIZA G. MASSAGUER. Tese de Doutorado: Avaliação de propriedades in vitro e in vivo de scaffolds de plga incorporados com óleo-resina de Copaíba preparada por eletrospinning. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. 2016.

PIRES, Ana Luisa; MORAES, A.M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. Revisão. Quím. Nova 38 (7). Ago 2015. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

Xingmao, L., Lin, H., Long, L., Ya, T., Qibin, L., Haibo, X., ... Geng, T. (2019). Ac ce us t. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1697171>

Connor, R. A. O., Cahill, P. A., & Mcguinness, G. B. (2021). Effect of electrospinning parameters on the mechanical and morphological characteristics of small diameter PCL tissue engineered blood vessel scaffolds having distinct micro and nano fibre populations – A DOE approach. *Polymer Testing*, 96(December 2020), 107119. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107119>