



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



NATAL - RN

18 a 22 de outubro de 2015

MATRIZES 3D DE PCL COBERTAS POR NANOFIBRAS DE PLGA PARA A ENGENHARIA DE TECIDOS

Natasha Maurmann^{1,2*}, Daniela Burguez¹ (IC), Daniela P. Pereira¹ (IC), Frederico D. A. de S. Pereira³, Paulo Inforçatti Neto³, Rodrigo A. Rezende³, Jorge V. L. da Silva³ e Patricia Pranke^{1,2,4}

1 - Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS, natasha.maurmann@ufrgs.br

2 - Programa de Pós graduação em Fisiologia – UFRGS, Porto Alegre – RS

3 - Divisão de Tecnologias Tridimensionais – CTI Renato Archer, Campinas – SP

4 - Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre – RS

Resumo: Biopolímeros podem ser usados na produção de matrizes como suporte mecânico no crescimento celular na medicina regenerativa. Dois exemplos são a policaprolactona (PCL) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) usados no presente estudo para avaliar as células-tronco mesenquimais em matrizes de PCL produzidos por impressão 3D e cobertos com fibras de PLGA obtidas por eletrospinação. Por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar as fibras de PLGA integradas nas matrizes 3D. A presença de células aderidas foi confirmada por microscopia confocal e eletrônica e a análise da liberação da desidrogenase láctica mostrou que as matrizes não foram citotóxicas. A combinação dos dois polímeros permitiu a produção de um suporte com maior estabilidade mecânica devido à presença de PCL depositado em filamentos e a adesão celular devido às fibras de PLGA. As matrizes são adequadas para utilização em terapia celular e podem ser utilizadas na regeneração de tecidos.

Palavras-chave: poli(ϵ -caprolactona), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), impressão 3D, eletrospinação, engenharia de tecidos.

3D printed PCL scaffolds covered by PLGA nanofibers for tissue engineering

Abstract: Biopolymers, can be applied to produce scaffolds as mechanical support for cell growth in regenerative medicine. Two examples are polycaprolactone (PCL) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) both used in this study to evaluate mesenchymal stem cells on PCL scaffolds produced by 3D printing and covered with fibers made from PLGA obtained by electrospinning. With scanning electron microscopy, it was observed that the electrospun fibers were integrated into the 3D matrices. Confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy confirmed the presence of attached cells and the lactate dehydrogenase released test showed the scaffolds were not cytotoxic. The combination of the two polymers facilitated the production of a support with greater mechanical stability due to the presence of PCL deposited in the filament and cell adhesion due to the PLGA fibers. The scaffolds are suitable for use in cell therapy and also for tissue regeneration purposes.

Keywords: poly(ϵ -caprolactone), poly(lactic-co-glycolic acid), 3D printing, electrospinning, tissue engineering.

Introdução

A engenharia de tecidos requer biomateriais adequados para servir como suportes tridimensionais de células e tecidos [1]. Poliésteres alifáticos, tais como a policaprolactona (PCL) e o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), pertencem a uma família de polímeros sintéticos biodegradáveis, os quais são utilizados na medicina. Esses polímeros têm excelente compatibilidade com os tecidos e degradabilidade que são aspectos críticos para a sua utilização bem sucedida no corpo humano. Além disso, esses polímeros foram aprovados para aplicações biomédicas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) [2].

A PCL é amplamente utilizada na engenharia de tecidos como um material elástico para a preparação de dispositivos implantáveis de longa duração com propriedades mecânicas e

estabilidade estrutural. A PCL é um exemplo de um material polimérico sintético que é utilizado habitualmente na biofabricação, como a impressão 3D. A impressão 3D (também conhecida como prototipagem rápida) é uma tecnologia que pode ser utilizada para a produção de tecidos e órgãos [3].

O PLGA é um polímero geralmente usado na engenharia de tecidos devido às suas excelentes propriedades de adesão celular, proliferação e degradação [2]. A técnica de eletrofiação facilita a fabricação de fibras nanoestruturadas com dimensões semelhantes aos componentes da matriz extracelular e mimetiza a sua estrutura fibrilar, fornecendo sinais essenciais para a organização, sobrevivência e funções celulares [4].

Células-tronco mesenquimais (CTMs) constituem uma parte fundamental da engenharia de tecidos, com aplicações terapêuticas promissoras para a regeneração do tecido, auto-imunidade, inflamação e doença degenerativa [5]. Essas células são muitas vezes utilizadas em combinação com os biomateriais em engenharia de tecidos, com o objetivo de reparar ou reconstruir tecidos e órgãos.

O presente estudo investigou a interação entre os biomateriais e as CTMs. Os suportes foram produzidos com a utilização de impressão 3D para fabricar matrizes de PCL com propriedades mecânicas, coberta por fibras de PLGA obtidas por eletrofiação para melhorar a fixação celular.

Experimental

Matrizes de PCL produzidas por impressão 3D

Os suportes de PCL (estruturas porosas no formato de estacas de madeira, Fig. 1B) foram fabricados por impressão 3D utilizando a impressora chamada Fab@CTI [6] por um processo de extrusão de filamentos fundidos. A impressora Fab@CTI foi construída e adaptada pelo Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI), com o objetivo de colaborar em iniciativas de pesquisa nas áreas de bioengenharia e biomateriais, com parceiros em diferentes instituições de pesquisa. A Fab@CTI pode usar materiais em diferentes condições como filamento, pó e estado fluido. Os suportes foram impressos com 2 camadas de 0,4 milímetros e cortados em formas circulares com diâmetros de aproximadamente 6 mm. As hastes foram produzidas com 1 mm de separação, que se refere ao espaço encontrado entre as camadas da estrutura.

Nanofibras de PLGA desenvolvidas por eletrofiação como cobertura de matrizes 3D

O PLGA foi utilizado para a eletrofiação conforme usado rotineiramente pelo presente grupo [7]. Em resumo, 12% de PLGA (75/25) foram dissolvidos em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. A solução do polímero foi colocada entre os eletrodos que foram ligados a uma alta tensão. As tensões aplicadas para a produção das nanofibras foram de 11kV e 1kV correspondente aos eletrodos positivo e negativo, respectivamente. A solução de polímero foi colocada em uma seringa equipada com uma agulha de aço 21G x 1" (0,8 mm x 25 mm), a 15 cm de distância da placa coletora, com um fluxo de 0,019 mL/min. As fibras foram formadas aleatoriamente sobre a placa coletora contendo matrizes 3D de PCL de 6 mm de diâmetro. Utilizou-se 0,45 mL da solução de polímero de PLGA sobre a placa coletora de 28,27 cm² de área, totalizando 4,5 µL de solução polimérica em cada lado dos suportes 3D, formado as estruturas de PCL cobertas com nanofibras de PLGA em ambos os lados. Subsequentemente, as matrizes foram colocadas sob luz ultravioleta durante 1h30min em uma câmara de fluxo laminar vertical (45 minutos para cada lado) para esterilização e, em seguida, em placas de cultura de 96 poços.

Estabelecimento, caracterização e cultura das células nas matrizes

As células-tronco mesenquimais foram coletadas, cultivadas e caracterizadas de acordo com os procedimentos padrões rotineiramente utilizados pelo presente grupo de pesquisa [8]. As células foram isoladas a partir de cordão umbilical humano (Registro na comissão de ética na Plataforma Brasil N° 36211214.3.0000.5347) e foram mantidas em meio DMEM, pH 7,4 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em uma

atmosfera saturada de água com 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias e as células foram sub-cultivadas quando atingiam a confluência utilizando 0,05% de tripsina/EDTA. As CTMs foram caracterizadas por citometria de fluxo e pela capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e utilizadas nos experimentos descritos abaixo. As células (51 x 10³) foram semeadas em uma das superfícies da estrutura de PCL+PLGA. Os poços de placas de cultura de 96 poços sem matrizes foram utilizados como controle. Após 48 horas, as matrizes foram viradas e o mesmo número de CTMs foi semeado na outra face das estruturas, totalizando 102 x 10³ células semeadas nas matrizes ou nos poços utilizados como controles. Após 48 horas, os testes foram realizados.

Microscopia de contraste de fase

O diâmetro do suporte 3D foi analisado nas imagens obtidas por microscopia de fase (microscópio Nikon Eclipse Ti) e determinado utilizando o programa ImageJ (*National Institutes of Health*).

Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia e o diâmetro das fibras, bem como a presença de células foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (microscópio Zeiss Evo 50, Carl-Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e determinados utilizando-se o programa ImageJ. As matrizes contendo células foram lavadas em solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,4), fixadas com 3% de glutaraldeído em PBS durante 30 minutos, lavadas com PBS, desidratadas em uma série crescente de etanol (até 100%) e secas em dessecador. As amostras foram metalizadas com uma fina camada de platina e as imagens foram obtidas usando-se aceleração de voltagem de 10 kV e ampliação de 1.000-20.000x.

Microscopia confocal de varredura a laser

A presença de células aderidas às matrizes foi analisada por microscopia confocal de varredura a laser. As amostras foram lavadas em tampão fosfato (pH 7,4), fixadas em tampão paraformaldeído a 4% durante 20 minutos e lavadas em tampão PBS. As células-tronco foram permeabilizadas com Triton-X e a actina dos citoplasmas foi corada de vermelho com 50 µg/mL de faloidina conjugada com rodamina (40 minutos). As matrizes foram lavadas com PBS. Os núcleos celulares foram corados de azul com 0,5 µg/mL de 4,6- diamidino-2-fenilindole, DAPI (1 minuto). As fotografias foram obtidas em microscópio confocal de varredura a laser (Zeiss Modelo LSM 700) e objetiva EC Plan-Neofluar 10x/0.30.

Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade foi avaliada por medição da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante da cultura. A LDH é uma enzima intracelular e a sua presença no ambiente extracelular é indicativo de danos celulares. A concentração mais elevada dessa enzima no meio extracelular é relacionada com a ruptura de membrana plasmática e consequente maior a morte celular. O ensaio (kit Labtest) foi realizado 48 horas após a segunda semeadura celular. Como controle negativo, foram utilizadas as células cultivadas diretamente nos poços das placas e como controle positivo foram utilizadas as células cultivadas nas placas tratadas com 1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), durante 20 minutos. Triton X-100 provoca a morte celular permitindo a liberação total de LDH. As medições foram realizadas no equipamento LabMax 560 (Labtest Diagnóstica SA).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão e avaliados utilizando ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Diferenças estatísticas significativas foram estabelecidas com p<0,05. Os dados foram analisados com o software SPSS (IBM SPSS Statistics 21; SPSS Inc, Chicago, EUA).

Resultados e Discussão

Suportes de PCL cobertos por PLGA (PCL+PLGA)

A Fig. 1A mostra o aspecto macroscópico da matriz produzida, constituída de um suporte de PCL coberto por nanofibras de PLGA dos dois lados. O aspecto dos suportes 3D é mostrado na Fig. 1B por microscopia de contraste de fase. Os suportes de PCL foram construídos em duas camadas com diâmetros diferentes: o diâmetro da camada inferior foi $797,5 \mu\text{m}$ com desvio padrão de $61,0 \text{ mm}$ e o superior foi $581,2 \pm 13,9 \mu\text{m}$, medido no centro da haste. O diâmetro médio das fibras de PLGA, avaliadas por microscopia eletrônica de varredura foi de $610,0 \pm 323,8 \text{ nm}$, sem a presença de grânulos nas nanofibras (Fig. 1C). Na Fig. 1D é possível visualizar a interação do suporte 3D de PCL com as nanofibras de PLGA.

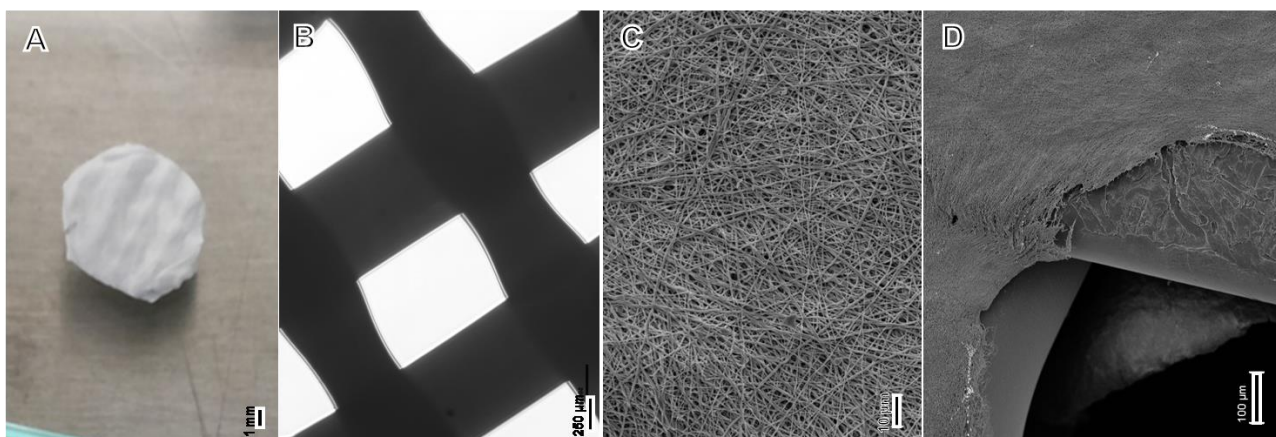


Figura 1 – Aspecto de (A) matrizes de PCL+PLGA, macroscopicamente, (B) suportes de PCL obtidos por impressão 3D, (C) fibras de PLGA obtidas por eletrofição e (D) interação da matriz 3D de PCL com nanofibras de PLGA.

Interação das células com as matrizes de PCL+PLGA

A presença das células aderidas nas matrizes foi confirmada por microscopia confocal de varredura a laser e microscopia eletrônica de varredura. A Fig. 2 mostra as células com o corante nuclear DAPI em azul (Fig. 2A), os filamentos de actina do citoesqueleto em vermelho corados com faloidina (Fig. 2B), a sobreposição digital de DAPI e faloidina (Fig. 2C) e o aspecto das células e das fibras de PLGA por microscopia eletrônica de varredura (Fig. 2D).

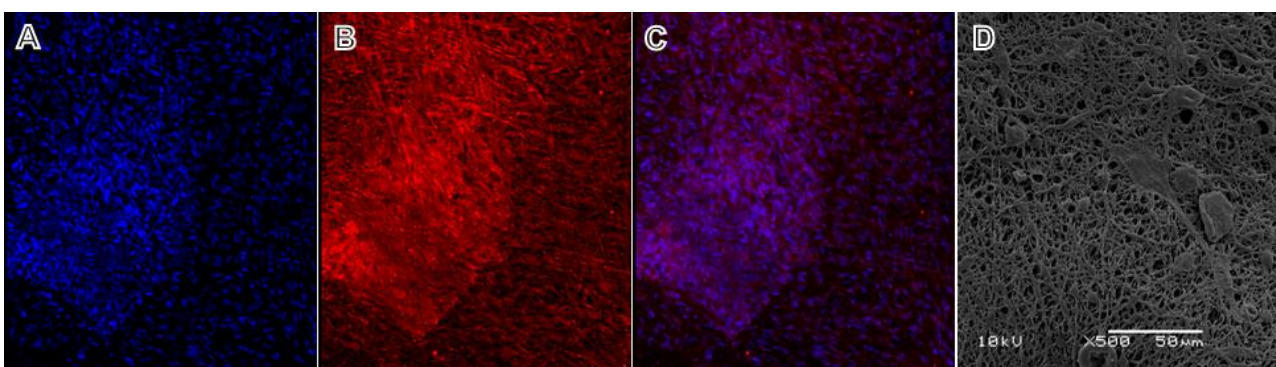


Figura 2 – CTMs aderidas nas matrizes. Microscopia confocal de varredura a laser com coloração com (A) DAPI (núcleos azuis), (B) faloidina (citoesqueletos vermelhos), (C) fusão de DAPI e faloidina. (D) Microscopia eletrônica de varredura mostrando o aspecto das fibras e as células. Em A, B e C, ampliação de 100x.

Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade dos suportes de PCL revestidos por nanofibras de PLGA foi avaliada pela concentração de LDH medida no sobrenadante de cultura de células. O ensaio de liberação de LDH mostrou que as matrizes não foram citotóxicas. A Tabela 1 mostra as médias e desvios-padrão de liberação de LDH (U/L). Não houve diferença estatística significativa entre o grupo controle (células cultivadas na placa) e as matrizes de PCL+PLGA. O controle de morte celular (células tratadas com Triton) foi utilizado como o controle positivo para a morte celular e liberou estatisticamente mais LDH do que as células cultivadas na placa e nas matrizes, com $p=0,000$.

Tabela 1 – Teste de citotoxicidade das matrizes (liberação de LDH).

	Controle	Matrizes	Controle de morte
LDH (U/L)	192,5 ± 37,5	223,3 ± 9,2	1.039,7 ± 46,2***

*** $p=0,000$

Conclusões

A estrutura polimérica combinada estudada no presente trabalho permitiu a produção de um suporte com uma maior estabilidade mecânica devido à presença de PCL (e também devido ao desenho de impressão controlada) construído com impressora 3D e, além disso, a adesão celular aumentada devido às fibras de PLGA nanoestruturadas que mimetizam a matriz extracelular. As matrizes não apresentaram efeito citotóxico sobre as células-tronco mesenquimais. Esse suporte produzido por impressão 3D de PCL e coberto por nanofibras de PLGA, obtidas por eletrofiiação, e revestido com células-tronco pode ser utilizado na terapia celular e na medicina regenerativa.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Instituto de Pesquisa com Células-tronco e INCT-BIOFABRIS. N. Maurmann agradece a Bolsa de Pós-Doutorado – DOCFIX (FAPERGS/CAPES).

Referências Bibliográficas

1. N.L. Davison; F.B. Groot; D.W. Grijpma, in *Tissue Engineering*, C.A.V. Blitterswijk; J. Boer, Ed.; Academic Press, Oxford, 2014, 177-215.
2. A. Musyanovych; K. Landfester. *Material Matters*. 2012, 7, 30-32.
3. A. Skardal; A. Atala. *Annals of Biomedical Engineering*. 2015, 43, 730-746.
4. W.E. Teo; W. He; S. Ramakrishna. *Biotechnology Journal*. 2006, 1, 918-929.
5. I. Ullah; R.B. Subbarao; G.J. Rho. *Bioscience reports*. 2015, BSR20150025.
6. A.L. Lixandrão; P.Y.C. Cheung; P.Y. Noritomi; J.V.L. da Silva; N. Colangelo; H. Kang; H. Lipson; J.T. Butcher; E. Malone. P. Inforçatti Neto. *Innovative Developments in Design and Manufacturing*. Leiria: CRC Press, Portugal, 2009, 469-473.
7. G.A.X. Acasigua; L. Bernardi; D.I. Braghirolli; M. Sant'ana Filho; P. Pranke; A.C.M. Fossati. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014, 9, 330-337.
8. R. Canabarro; H. Sporleder; T. Gomes; G. Zanatta; L. Scribel; F. Freitas; J. Neumann; P. Pranke. *Biocell* (Mendoza). 2007, 31, 397-403.