

Gerson Arisoly Xavier Acasigua^{1*}, Daniela Steffens^{2,3*}, Joelson Tomedi³,
Tattiana Enrich Essvein⁴, Juliana Figueiredo Faria⁴, Vinicius Coelho Carrard⁵,
Anna Christina Medeiros Fossati⁵, Patricia Pranke^{2,3,6}

patriciapranke@ufrgs.br

* Autores com a mesma importância nesse trabalho

1 Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2 Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3 Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

4 Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

5 Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

6 Instituto de Pesquisas com Células-tronco

Resumo— As malformações congênitas e perdas de tecidos especializados tais como osso, músculo, pele, entre outros representam um desafio à cirurgia reparadora. Atualmente, uma área de pesquisa biomédica, denominada engenharia de tecidos, é uma ciência que alia conhecimentos de biologia e engenharia e que estuda novas formas de produção de tecidos para uso em cirurgias reparadoras. Entre os biomateriais utilizados, as chamadas matrizes ou *scaffolds* podem ser formadas por fibras em escala nanométrica, que, quando associados à terapia celular, simulam a matriz extracelular, funcionando como arcabouço para a adesão e proliferação celular. No entanto, é necessário, que os materiais utilizados possuam biocompatibilidade com os tecidos adjacentes. Devido a isso, esse trabalho teve como finalidade verificar a biocompatibilidade de diferentes tipos de *scaffolds*, analisando a reação tecidual quando os mesmos foram implantados subcutaneamente em ratos.

Palavras-chave: *bioengenharia, electrospinning, scaffolds, biocompatibilidade*

Introdução

Os casos de malformações congênitas e perdas de tecidos especializados como o tecido ósseo, muscular, cutâneo, entre outros representam um desafio à cirurgia reparadora. Uma nova área de pesquisa biomédica, denominada engenharia de tecidos (ET), alia o conhecimento de biomateriais, células e biomoléculas para a formação de tecidos humanos. Entre os biomateriais utilizados na ET existem matrizes, ou *scaffolds*, que irão funcionar como arcabouço para a adesão e proliferação celular. Diversas técnicas são utilizadas para a produção dos *scaffolds*, entre elas a técnica de *electrospinning*. Essa técnica funciona pelo princípio eletrostático, onde são processados diferentes polímeros derretidos ou soluções poliméricas produzidos a partir de diferentes associações de polímeros e solventes. Durante o processo, o solvente irá evaporar e o que restará serão fibras poliméricas de dimensões nanométricas ou micrométricas, produzindo, assim, os *scaffolds* de nanofibras que simulam a matriz extracelular. Polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados para a produção desses *scaffolds*. Com o foco na regeneração tecidual, os materiais desenvolvidos devem ser biodegradáveis, biorreabsorvíveis e biocompatíveis para serem introduzidos no organismo animal [1,2]. Entre os polímeros sintéticos disponíveis há o co-polímero ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA), o qual é uma associação entre os polímeros de ácido lático e de ácido glicólico, sendo o PLGA comumente utilizado na ET. A degradação do PLGA nos tecidos humanos ocorre através da hidrólise de suas ligações ésteres para produzir os monômeros ácido lático e ácido glicólico. Desse modo, esse polímero é facilmente metabolizado no organismo via o ciclo de Krebs e então é eliminado, sendo o mesmo amplamente utilizado. Outro polímero sintético bastante utilizado na bioengenharia é o poli (DL-ácido-lático) (PDLA), que é um ácido com alto peso molecular e que possui boa biocompatibilidade. Os *scaffolds* de PDLA podem ser associados à microalga *Spirulina*, a qual apresenta funções biológicas muito importantes. Essa alga é rica em proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais. Alguns estudos clínicos demonstraram que essa microalga contém polissacarídeos com efeitos antiinflamatórios e ácidos graxos com propriedades antibacterianas e antifúngicas [3-5]. Com isso, está comprovado que a *Spirulina* pode ser usada como um aditivo farmacêutico ou nutritivo sem causar riscos à saúde [6-8]. Entre os polímeros naturais, existe o ácido hialurônico e o colágeno, os quais são materiais extensivamente pesquisados para a produção de *scaffolds*. O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular natural e a sua sequência de aminoácidos é altamente conservada entre diferentes espécies de vertebrados. Por essa razão, os produtos derivados do colágeno apresentam baixa imunogenicidade, mesmo quando obtidos de fontes xenogênicas. O ácido hialurônico é membro de uma classe de polissacarídeos denominados

glicosaminoglicanos. Fisiologicamente, ele apresenta um papel importante nos processos de migração celular, regeneração tecidual e modulação da resposta inflamatória. O requisito mínimo para a implantação de materiais em tecidos vivos é a biocompatibilidade. Qualquer um material estranho é colocado no interior de tecidos vivos, o mesmo provoca uma resposta que varia quanto a sua extensão, intensidade e duração, determinando assim a sua biocompatibilidade ou não, ou seja, um estado de mútua coexistência entre um material e o ambiente fisiológico [9]. Dessa forma, o presente trabalho teve por finalidade verificar a biocompatibilidade de diferentes composições de *scaffolds* implantados em tecido subcutâneo de ratos, após diferentes períodos experimentais.

Parte Experimental

Doze ratos wistar (*rattus norvegicus albinus wistar*) machos, com 60 dias de vida, foram mantidos em estantes ventiladas, com temperatura controlada (22°C) e ciclo claro-escuro de 12 h. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Os 12 ratos foram divididos em quatro períodos experimentais (7, 14, 30 e 60 dias) para a análise do processo inflamatório após implantação dos *scaffolds*.

Cada animal foi anestesiado e submetido à tricotomia da região dorsal, a qual foi executada manualmente, assim como a área de implante foi desinfetada com solução de álcool-iodo. Cinco incisões de 0,5 cm de comprimento foram realizadas no dorso do animal com pelo menos 2 cm de distância uma da outra. Com o uso de uma tesoura apropriada e, divulsionando a lateral do tecido subcutâneo, cinco cavidades cirúrgicas foram preparadas. Tubos de polietileno, com cerca de 5 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro, foram autoclavados para que os *scaffolds* fossem então colocados em seu interior. Os *scaffolds* foram preparados de acordo com os protocolos já estabelecidos e introduzidos nos tubos de polietileno em capela de fluxo laminar. Os quatro tipos de *scaffolds* foram desenvolvidos conforme descritos a seguir. Os *scaffolds* de colágeno foram produzidos com gelatina e ácido hialurônico na proporção de (9:1). As concentrações usadas para a produção de matrizes por *electrospinnig* foram 7 mg/mL. A solução de PDLLA utilizada foi 7% (m/m). A solução de PDLLA com *Spirulina* foi de 8% (m/m) de PDLLA e 2% (m/m) de *Spirulina*. A solução de PLGA foi utilizada na concentração de 12% de PLGA (m/v). Os tubos de polietileno foram preenchidos com os *scaffolds* foram inseridos em cavidades cirúrgicas paralelamente à incisão. Os tubos foram distribuídos da seguinte maneira:

- 1- tubo com *scaffold* de PLGA
- 2- tubo com *scaffold* de colágeno e ácido hialurônico
- 3- tubo com *scaffold* de PDLLA
- 4- tubo com *scaffold* de PDLLA + *Spirulina*
- 5- tubo controle, sem material

Inicialmente, os *scaffolds* das diferentes composições foram confeccionados e introduzidos nos tubos de polietileno para que os mesmos fossem cortados com 5 mm de comprimento (figura 1 A, B, C, D).

Para atingir o objetivo, os animais foram anestesiados e submetidos à implantação de tubos de polietileno contendo as diferentes composições de *scaffolds* (figura 2). Decorrido cada período experimental (7, 14, 30 e 60 dias) pós-operatório, 3 ratos foram selecionados aleatoriamente e sacrificados para a análise das regiões de interesse ao estudo.

Imediatamente após o sacrifício, foi realizada novamente uma tricotomia e biópsia excisional da área do implante, com uma margem de segurança de 1 cm. As amostras obtidas foram colocadas em papel disco e fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas. Em seguida, foram submetidas ao processamento histológico de rotina, e emblocadas em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram realizados no longo eixo de cada tubo e corados com hematoxilina e eosina.

Dessa forma, com o auxílio de um microscópio óptico de luz, foi possível verificar o tipo e a intensidade do processo inflamatório relacionado à implantação subcutânea de cada uma das diferentes composições de *scaffolds*.

A biocompatibilidade foi avaliada por análise do infiltrado inflamatório. O componente inflamatório celular foi identificado pela presença de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes. Os cortes foram analisados com o auxílio de um microscópio ótico por um pesquisador experiente e calibrado. Os eventos inflamatórios foram classificados de acordo com a seguinte escala: (1) ausente: a inflamação estava ausente ou dentro dos vasos sanguíneos, (2) leve: as células estavam presentes, embora esparsas ou em grupos reduzidos, (3) moderada: as células estavam presentes, mas não dominam o campo microscópico e (4) intensa: as células estavam presentes na forma de um infiltrado perto do material usado. Baseado nessa escala, as reações inflamatórias foram avaliadas nos cinco grupos de estudo. A condensação das fibras foi classificada de acordo com a seguinte escala: (1) ausência de fibras colágenas, (2) presença de uma fina camada de fibras colágeno e (3) presença de uma espessa camada de fibras colágenas. O abscesso em formação foi classificado da seguinte forma: (1) ausência de abscesso, (2) presença de abscesso em contato com a cavidade onde o material cirúrgico foi inserido e (3) presença de abscesso de áreas de abscesso longe da cavidade cirúrgica onde o material foi inserido. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFRGS (n° 23582).

O teste de Friedman foi utilizado para comparar as variáveis entre os grupos de estudo, uma vez que esse estudo examinou amostras dependentes. Sempre que diferenças estatisticamente significativas foram observadas, o teste de Friedman foi complementado com o teste de Wilcoxon. Quando as variáveis foram avaliadas entre os diferentes períodos experimentais, a comparação entre os resultados foi realizada para amostras independentes e foi realizado o Teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste U de Mann-Whitney, para os casos onde as diferenças estatisticamente significativas foram detectadas. O nível de significância foi fixado em 0,05.

Resultados e Discussão

Por meio dos dados obtidos a partir das lâminas histológicas (figura 3), não foi possível estabelecer diferença estatística entre as variáveis analisadas no estudo. No entanto, houve uma tendência de aumento estatisticamente significativo nas respostas inflamatórias aos *scaffolds* de PDLLA/*Spirulina* (grupo 4) (neutrófilos, $p = 0,05$; linfócitos/plasmócitos, $p = 0,09$). A presença de abscessos também mostrou uma tendência de aumento no grupo 4 ($p = 0,07$). Não houve diferença estatística, em todos os grupos, quanto ao aparecimento de fibroplasia, bem como a presença de eosinófilos, macrófagos/células gigantes e linfócitos/plasmócitos.

Devido à falta de diferença estatística nos resultados, a partir dos 12 animais que fizeram parte da fase I do estudo inicial, realizou-se novo cálculo do tamanho da amostra para os grupos, utilizando-se como base os resultados da variável “neutrófilos”. O tamanho de cada grupo ficou entre 6 e 7 (poder de 80%, alfa de 5% (bicaudal) para permitir a observação de diferenças de 1 ponto). Dessa forma, um número adicional de 12 ratos (3 animais para cada período experimental) foram submetidos aos testes de biocompatibilidade, com a finalidade de estabelecer uma amostra representativa e dados mais consistentes. As amostras obtidas desses animais estão sendo processadas para posterior análise.

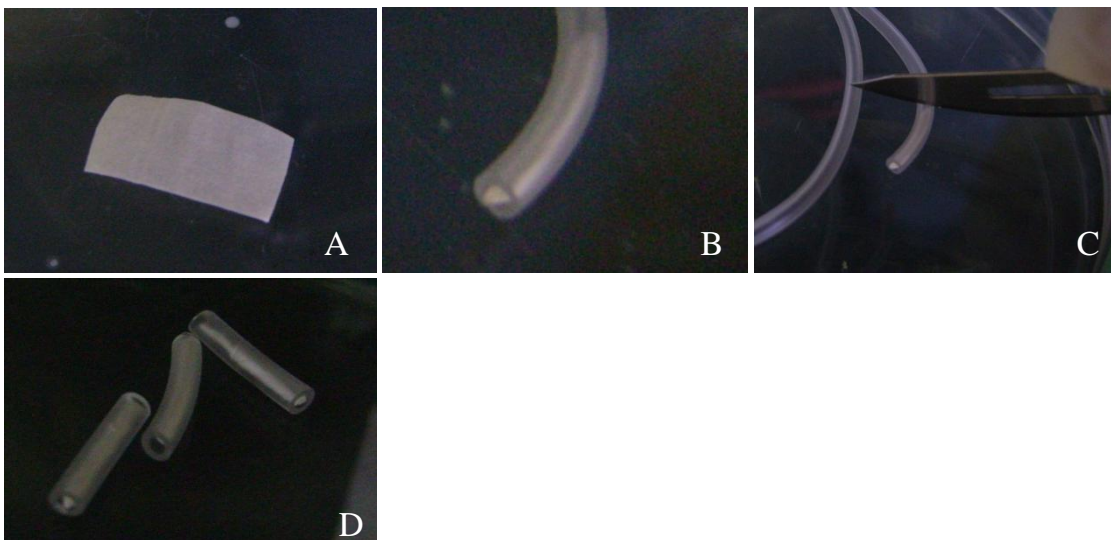


Figura 1- (A e B) *Scaffold* produzido a partir da solução de PLGA e parte do *scaffold* retirado e introduzido no tubo de polietileno. (C e D) *Scaffold* introduzido no tubo e o corte realizado para confecção de tubos de 5 mm de comprimento.

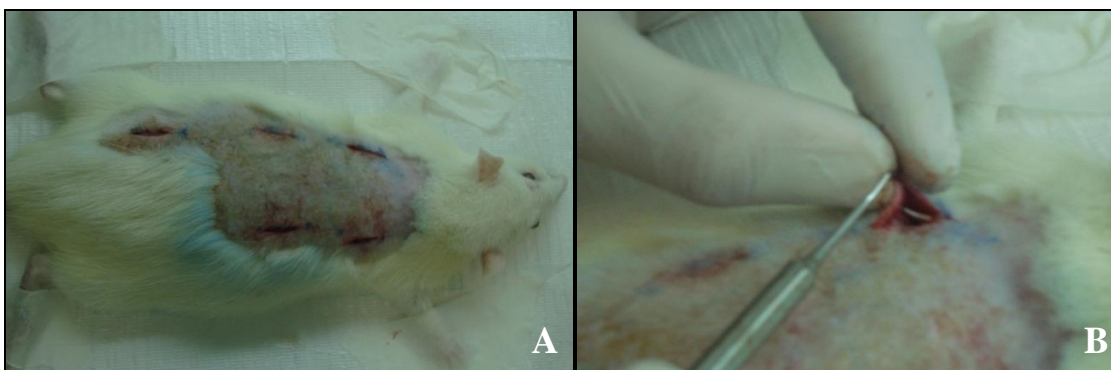


Figura 2. (A) Rato anestesiado e incisado em sua região dorsal para implantação dos tubos. (B) Momento da implantação do tubo.

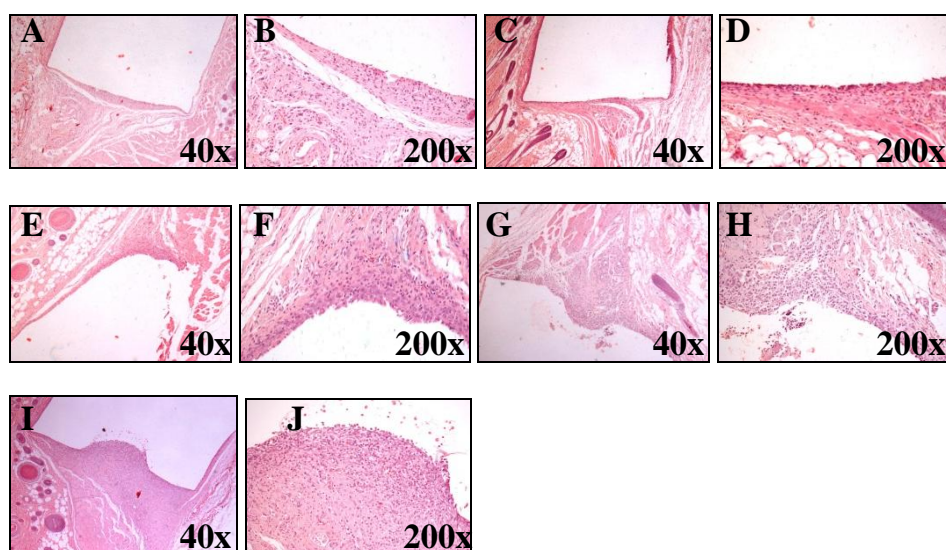


Figura 3. (A e B) Amostra do grupo controle aos 14 dias. (C e D) Amostra do grupo ácido hialurônico aos 14 dias. (E e F) Amostra do grupo PLGA aos 14 dias. (G e H) Amostra do grupo PDLLA sem *Spirulina* aos 14 dias. (I e J) Amostra do grupo PDLLA com *Spirulina* aos 14 dias.

Conclusão

Os resultados parciais obtidos através da análise histológica dos 12 animais estudados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os materiais, indicando serem os mesmos apropriados para uso na engenharia de tecidos. No entanto, como houve uma tendência para o aumento estatístico nas respostas inflamatórias e presença de abscessos nos *scaffolds* de PDLLA/*Spirulina*, optou-se por aumentar o número de amostras para confirmação da biocompatibilidade ou não desse grupo de biomaterial. A fibroplasia, a presença de eosinófilos, macrófagos/células gigantes e L/P também não apresentaram diferença estatística entre os grupos. A fim de confirmar os resultados, foram incluídos no estudo mais 12 animais, com o objetivo de aumentar o tamanho da amostra. As análises relacionadas ao novo grupo de 12 animais estão sendo realizadas. No entanto, os resultados parciais já analisados indicam que os biomateriais, com exceção do grupo PDLLA/*Spirulina*, parecem apresentar uma resposta adequada dos tecidos quando implantados no tecido conjuntivo de ratos e podem ser considerados como uma ferramenta biocompatível e, portanto, apropriada para uso na engenharia de tecidos.

Agradecimentos

Agradecimento ao CNPq, FAPERGS e Instituto de Pesquisa com Células-tronco, Porto Alegre, Brasil, pelo apoio financeiro.

Referências

1. S. H. Barbanti, et al. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2005, 15 (1), 13.
2. U. Boudriot, et al. *Macromol Symp*. 2005, 225, 09.
3. Z. Khan, et al. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005, 6 (5), 373.
4. P. D. Karkos, et al. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008.
5. A. Kulshreshtha, et al. *Curr Pharm Biotechnol*. 2008, 9 (5), 400.
6. L. R. Moreno; R. O. Ramírez. *INCI*. 2006, 31 (9), 657.
7. M. G. Morais, et al. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 2872.
8. D. Steffens, et al. *J. Biom. Nanotech*. 2013, 9 (4), 710.
9. R. F. E. Calixto, et. al. *Pesqui. Odontol. Bras*. 2001, 15 (3), 257.