



13º CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS



NATAL - RN
18 a 22 de outubro de 2015

PRODUÇÃO DE SCAFFOLDS COM POLI(LLA-co-TMC): USO NA ENGENHARIA DE TECIDO VASCULAR

Daikelly I. Braghirolli^{1,2*} (D), Virgínia E. Helfer¹ (IC), Douglas Gamba³, Marcos L. Dias⁵ 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, daikellyib@gmail.com

2 – Programa de Pós Graduação em Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS

3 – Departamento de Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS

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

5 - Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano-IMA, Rio de Janeiro - RJ

Resumo: Em casos de doenças arteriais periféricas graves, a lesão do tecido vascular pode ocorrer. Nesse caso, pode ser necessário o implante de um enxerto no local da lesão. Os copolímeros de carbonato de trimetileno apresentam grande elasticidade, sendo bastante pesquisados para aplicação na engenharia de tecido vascular. No presente trabalho, o copolímero poli(ácido láctico-co-carbonato de trimetileno) (poli(LLA-co-TMC=60/40) foi sintetizado e utilizado na produção de *scaffolds* vasculares, produzidos pela técnica de *electrospinning*, e avaliados quanto às suas propriedades físico-químicas. Os *scaffolds* apresentaram fibras lisas, sem *beads*, com diâmetro médio de 585 ± 150 nm. O ensaio de degradação demonstrou uma redução de 60% do peso molecular polimérico em 90 dias. Os *scaffolds* apresentaram módulo de elasticidade comparável ao das artérias humanas, $1,35 \pm 0,18$ MPa. Dessa forma, os *scaffolds* produzidos a partir de LLA/TMC podem ser uma opção interessante para a engenharia de tecido vascular.

Palavras-chave: *scaffolds* vasculares, carbonato de trimetileno, doenças arteriais periféricas

Poly(LLA-co-TMC) scaffolds: use in vascular tissue engineering

Abstract: In severe cases of peripheral arterial diseases, vascular tissue injury may occur. In such cases, the implantation of a graft may be required. The trimethylene carbonate copolymers have been investigated for use in vascular tissue engineering, due their high elasticity. In this work, the copolymer poly(lactic acid-co-trimethylene carbonate) (poly(LLA-co-TMC) (LLA/TMC= 60/40) was synthesized and evaluated for the production of vascular scaffolds. They were produced by the electrospinning technique and evaluated for their physicochemical properties. The scaffolds showed smooth fibers, without beads, with an average diameter of 585 ± 150 nm. The degradation test showed that there was a 60% reduction in polymeric molecular weight in 90 days. The scaffolds showed Young's moduli comparable to human arteries, 1.35 ± 0.18 MPa. Thus, the scaffolds produced from LLA/TMC can be an interesting option for engineering of vascular tissue.

Keywords: *vascular scaffolds, trimethylene carbonate, peripheral arterial diseases*

Introdução

As doenças arteriais periféricas (DAP) são caracterizadas pela redução do aporte sanguíneo aos tecidos, decorrente da obstrução de vasos sanguíneos periféricos. Em casos mais graves, a gangrena e a perda do tecido podem ocorrer. Nessas situações, a intervenção cirúrgica com implante de um enxerto vascular pode ser necessária a fim de que o fluxo de sangue seja restaurado [1]. Nesses procedimentos, homoenxertos ou implantes sintéticos são utilizados. Contudo, ambas as técnicas apresentam limitações, principalmente quando substitutos vasculares de pequeno diâmetro (<6 mm) precisam ser utilizados [2].

A engenharia de tecidos é uma ferramenta que pode fornecer uma estratégia para a produção de *scaffolds* que podem ser utilizados como substitutos vasculares. Os *scaffolds* atuam como moldes, que suportam a reconstrução do tecido vascular lesado.

Para que possam ser utilizados com sucesso como substitutos vasculares, os *scaffolds*, além de biocompatíveis e não-trombogênicos, devem apresentar propriedades físico-químicas adequadas, semelhantes às dos vasos sanguíneos naturais. Dessa forma, um *scaffold* vascular deve apresentar elasticidade, taxa de degradação relativamente lenta e resistência mecânica capaz de suportar o fluxo hemodinâmico [2].

Copolímeros contendo carbonato de trimetileno (TMC) têm sido bastante estudados como biomateriais para aplicações que requerem substratos flexíveis para o crescimento celular [3, 4]. O TMC, à temperatura ambiente, é um polímero elastomérico e flexível. Na sua forma reticulada, apresenta elasticidade, resistência mecânica e integridade estrutural aumentadas, bem como tempo maior de degradação. [5, 6] Dessa forma, copolímeros contendo unidades constitutivas de carbonato de trimetileno mostram-se adequados para a produção de substitutos vasculares. Buscando uma alternativa para regeneração de vasos de pequeno diâmetro, o objetivo do presente trabalho foi produzir *scaffolds* utilizando um copolímero à base de carbonato de trimetileno e ácido láctico. Os *scaffolds* foram produzidos pela técnica de *electrospinning* e suas propriedades físico-químicas foram avaliadas.

Experimental

Produção do copolímero

O copolímero poli(ácido láctico-co-carbonato de trimetileno) (razão molar LLA/TMC=60/40) (LLA/TMC) (60/40) foi sintetizado através da técnica de polimerização por abertura de anel (Ring Opening Polymerization, ROP), utilizando os monômeros cíclicos: L-lactídeo e carbonato de trimetileno. A síntese do polímero foi realizada pelo Instituto de Macromoléculas (IMA) da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Produção dos scaffolds

Os *scaffolds* foram produzidos pela técnica de *electrospinning*. O copolímero poli(LLA-co-TMC) foi solubilizado em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. Diferentes concentrações dessa solução, assim como diferentes parâmetros de *electrospinning* foram testados para a produção dos *scaffolds*. Os parâmetros foram testados até que fibras uniformes e lisas fossem produzidas.

Espessura dos scaffolds, morfologia e diâmetro das fibras

A morfologia das fibras foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Microscópio JEOL JSM-6060), após a metalização das amostras com camada de ouro. O diâmetro médio das fibras foi determinado utilizando o *software* ImageJ 1.38x, a partir das imagens obtidas por MEV. Para essa determinação, 30 fibras de cada amostra (n=3) foram medidas. A espessura dos *scaffolds* foi determinada com micrômetro digital (Digimatic Micrometer MDC-25MY - Mitutoyo) (n=3).

Degradabilidade

Após produzidos, os *scaffolds* foram colocados em tubos falcon contendo 10 mL de PBS 1X. Os tubos foram mantidos sob agitação (100 rpm) a 37°C e pH 7,4 durante os períodos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias. Após esses períodos, os *scaffolds* foram retirados do tampão, lavados repetidamente com água destilada e secos a 30°C. A cada 4 dias, o tampão foi trocado para manutenção do pH, evitando que a degradação fosse acelerada. As amostras foram avaliadas quanto às mudanças de peso molecular em cromatógrafo de permeação em gel (GPC) (Viscotek VE 2001) equipado com detector de índice de refração, viscosimétrico e por espalhamento de luz. Os *scaffolds* foram dissolvidos em tetrahydrofurano (THF) e eluídos a uma vazão de 1 mL/min, a 45°C. Um padrão de poliestireno foi utilizado para obtenção da curva de calibração primária. Como controle da

determinação do peso molecular inicial, *scaffolds* recém produzidos, não colocados em PBS, foram analisados por GPC.

Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos *scaffolds* produzidos foram determinadas através da medida do módulo de elasticidade e da deformação máxima por meio de ensaios de tensão-deformação. Esses ensaios foram realizados na Central Analítica do Instituto de Química da UFRGS, no aparelho de análise dinâmico-mecânica (DMA) Q800 (*TA Instruments*). Para essas análises, os *scaffolds* foram recortados com bisturi para obtenção de amostras retangulares com dimensões de 5 x 12 mm. Os testes foram realizados à temperatura constante de 37°C, com uma rampa de força de 0,5N/min até carga máxima de 18N, sob uma força estática de 0,005N.

Resultados e Discussão

Espessura dos scaffolds, morfologia e diâmetro das fibras

Como citado anteriormente, diferentes concentrações da solução polimérica e diferentes parâmetros do *electrospinning* foram testados a fim de produzir *scaffolds* com fibras uniformes e lisas. Quando soluções poliméricas com concentrações inferiores a 14% foram avaliadas, observou-se a presença de gotejamento e de um jato instável, durante o procedimento da técnica de *electrospinning*. Dessa forma, a solução de poli(LLA-*co*-TMC) a 14% (m/v) em 1,1,1,3,3,3 – hexafluoro-2-propanol foi escolhida para a produção dos *scaffolds*. Os parâmetros utilizados na técnica de *electrospinning* foram: diferença de voltagem de 14kV entre os eletrodos positivo e negativo, distância de 20 cm entre a agulha e a placa coletora e uma vazão da solução de 1,14 mL/h. Utilizando-se tais parâmetros, fibras randomizadas, uniformes, sem *beads* e com superfície lisa foram produzidas (Fig. 1). Os *scaffolds* apresentaram uma espessura média de $136 \pm 9,8 \mu\text{m}$, enquanto suas fibras apresentaram diâmetro médio de $585 \pm 150 \text{ nm}$.

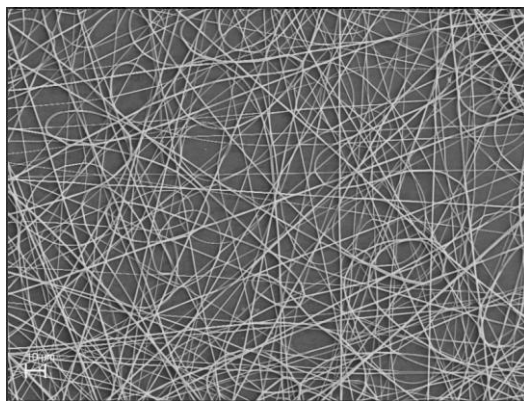


Figura 1. Fibras de poli(LLA-*co*-TMC) produzidas por *electrospinning*

Degradação

A característica biodegradável dos *scaffolds* é muito vantajosa para a engenharia de tecidos. A remoção fisiológica do substrato pelo organismo do hospedeiro evita que uma segunda cirurgia seja realizada nesse paciente para a remoção do biomaterial implantado [7]. O ideal é que o *scaffold* apresente uma taxa de degradação proporcional à taxa de regeneração do tecido ao qual é empregado. Assim, o *scaffold* é capaz de suportar o desenvolvimento tecidual sem atrasar ou prejudicar sua regeneração. Nesse estudo, a degradabilidade dos *scaffolds* de poli(LLA-*co*-TMC) foi avaliada por 60 dias. Nesse período, o copolímero apresentou uma redução de 68% do seu peso molecular inicial. Quando o perfil de degradação foi avaliado, observou-se que grande parte da degradação ocorreu logo no primeiro dia do estudo, quando o peso molecular polimérico apresentou

uma redução de 34% em relação ao dia zero. Após, a taxa de degradação permaneceu relativamente constante, entre 18 e 22%. A degradação dos polímeros de carbonato de trimetileno, assim como do ácido lático, ocorre através de hidrólise [8]. Dessa forma, o primeiro contato com o meio aquoso resultou na maior queda do peso molecular do polímero, como pode ser observado na figura 2.

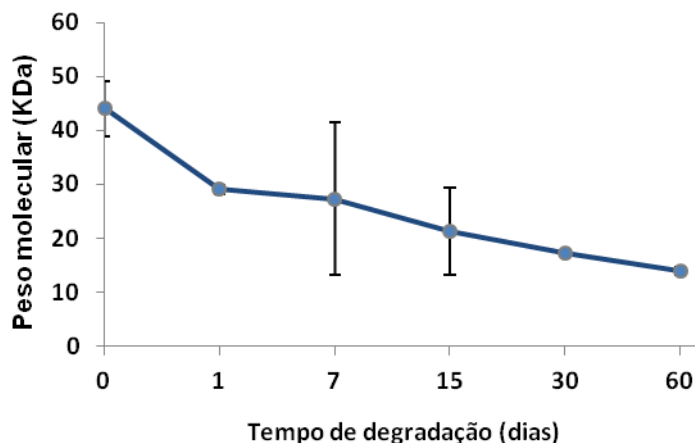


Figura 2. Ensaio de degradabilidade dos *scaffolds* de poli(LLA-co-TMC).

Propriedades mecânicas

Quando implantados, os *scaffolds* devem apresentar resistência à tração e elasticidade semelhantes às do tecido natural do local para que possam desempenhar com sucesso sua função de suporte à regeneração tecidual. Dessa forma, a avaliação das propriedades mecânicas do biomaterial é crucial para que a progressão da recuperação tecidual não seja limitada por falhas mecânicas do mesmo. Nesse trabalho, a deformação máxima e o módulo de elasticidade dos *scaffolds* produzidos foram avaliadas. Os *scaffolds* não romperam quando submetidos a altas tensões e apresentaram deformação máxima entre 135 e 149%. O módulo de elasticidade médio desses *scaffolds* foi de $1,35 \pm 0,18$ MPa. Assim, os *scaffolds* de poli(LLA-co-TMC) produzidos por *electrospinning* apresentaram características mecânicas comparáveis às artérias humanas, que apresentam elevada elasticidade e módulo de elasticidade entre 1,2 e 1,8 MPa [8]. Contudo, um problema observado com esses *scaffolds* foi a grande redução de suas dimensões quando colocados em meio aquoso. Nessa condição, os *scaffolds* reduziram até 50% de sua área inicial e apresentaram grande rugosidade. Essa característica pode ser um limitante para a aplicação desses *scaffolds* na engenharia de tecido vascular, visto que a redução no diâmetro de um enxerto tubular poderia ocasionar a redução do aporte sanguíneo ao tecido irrigado pelo mesmo e, ainda, formação de trombos no seu interior. Dessa forma, com o intuito de aperfeiçoar as características desses *scaffolds* para uso como substitutos vasculares, um copolímero poli(LLA-co-TMC) com proporção inferior a 40% de carbonato de trimetileno será sintetizado e avaliado.

Conclusões

O copolímero poli(LLA-co-TMC) (60/40) foi sintetizado e avaliado para a produção de *scaffolds* para uso na engenharia de tecido vascular. Com o copolímero foi possível produzir *scaffolds* com fibras distribuídas uniformemente em sua estrutura, com diâmetro semelhante ao das fibras de colágeno da matriz extracelular natural. Os *scaffolds* apresentaram degradabilidade compatível com a regeneração do tecido vascular e módulo de elasticidade comparável ao das artérias humanas. Contudo, esses *scaffolds* apresentaram grande redução de suas dimensões quando em contato com meio aquoso. A fim de contornar essa característica, um novo copolímero poli(LLA-co-TMC) com

proporção inferior a 40% de carbonato de trimetileno será sintetizado e avaliado para a produção de substitutos vasculares.

Agradecimentos

Os autores agradem ao CNPq, CAPES e Instituto de Pesquisa com Células-tronco (IPCT) pelo apoio financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. He, W., et al.; *Cell Biochem Biophys*. 2013, 66, 855.
2. Isenberg, B.C., C. Williams, and R.T. Tranquillo; *Circ Res*. 2006, 98, 25.
3. Dargaville, B.L., et al.; *Acta Biomater*. 2013, 9, 6885.
4. Yang, J., et al.; *J Biomed Mater Res A*. 2010, 94, 396.
5. Pego, A.P., et al.; *J Mater Sci Mater Med*. 2003, 14, 767.
6. Pego, A.P., et al.; *J Biomed Mater Res A*. 2003, 67, 1044.
7. Venugopal, J.R., et al.; *J R Soc Interface*. 2012, 9, 1.
8. Dargaville, B.L., et al.; *Biomacromolecules*. 2011, 12, 3856.