

HIDROGÉIS DE GELATINA METACRILATO INCORPORADOS COM NANOCRISTAIS DE CELULOSE PARA BIOFABRICAÇÃO 3D

Caroline F. Bellani^{1,4}; Carolina L. Morelli²; Ali Khademhosseini^{3,4,5}; Márcia C. Branciforti^{1*}

1 - Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP, marciacb@sc.usp.br

2 - Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, SP

3 - Center for Biomedical Engineering, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

4 - Harvard-Massachusetts Institute of Technology Division of Health Sciences and Technology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA 02139

5 - Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University, Boston, MA 02115

Resumo: A adição de nanocristais de celulose (CNC) em matrizes poliméricas melhora as propriedades mecânicas de scaffolds para engenharia tecidual de acordo com sua relação. A gelatina metacrilato fotopolimerizada com células (GelMA) é constituído por uma plataforma de hidrogel capaz de interagir e encapsular células durante a fotopolimerização e biofabricação em 3D, e tem uma grande área de superfície que pode ligar-se aos CNCs. O objetivo do presente trabalho foi a síntese e encapsulamento de células em hidrogéis GelMA incorporados com nanocristais de celulose, com o intuito de desenvolver um microambiente vascularizado com propriedades mecânicas adequadas. Os hidrogéis GelMA incorporados com nanocristais de celulose mostraram suportar a encapsulação e organização de células endoteliais em microvasos para subsequente vascularização tecidual, mostrando que os CNCs são candidatos potenciais para reforço em hidrogéis para aplicação em bioimpressão 3D e bioimpressão vascular.

Palavras-chave: GelMA; Nanocristais de Celulose; Biofabricação 3D

Methacrylate Gelatin Hydrogels Embedded with Cellulose Nanocrystals for 3D Biofabrication

Abstract: The addition of cellulose nanocrystals (CNC) in polymer matrices improves the mechanical properties of scaffolds for tissue engineering according to their ratio. The cell-laden gelatine methacrylate (GelMA) consists of a hydrogel platform capable of interacting with and encapsulating cells during photopolymerization and 3D biofabrication, and has a large surface area that can bind to the CNC. The objective of the present work was the synthesis and encapsulation of cells in GelMA hydrogels incorporated with cellulose nanocrystals, with the purpose of developing a vascularized microenvironment with adequate mechanical properties. GelMA hydrogels incorporated with cellulose nanocrystals were shown to support encapsulation and organization of endothelial cells in microvessels for subsequent tissue vascularization, showing that CNCs are potential candidates as reinforcement in hydrogels for application in 3D bioprinting and vascular bioprinting.

Keywords: GelMA; Cellulose Nanocrystals; 3D Biofabrication

Introdução

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar o qual aplica os princípios de engenharia e ciências biológicas no desenvolvimento de substitutos biológicos que recuperem, mantenham ou melhorem a função tecidual[1]. A metodologia em engenharia tecidual baseia-se em scaffolds, ou matrizes tridimensionais, os quais, de acordo com suas propriedades intrínsecas, modulam e guiam a diferenciação e proliferação celular, permitindo a reconstrução de diferentes tecidos[2, 3].

Os critérios gerais para desenvolver scaffolds apropriados à engenharia tecidual têm como bases o tipo de material utilizado, bem como sua arquitetura e porosidade, além da química da superfície e propriedades mecânicas adequadas[4]. Apesar de avanços significantes na área de engenharia tecidual terem ocorrido na última década, as estratégias tradicionais nesta área ainda resultam em implantes teciduais com baixa integração e sobrevivência devido à falta de vascularização nos tecidos

desenvolvidos [5]. Atualmente, estudos em bioengenharia de redes vasculares vêm sendo amplamente utilizados empregando scaffolds de hidrogéis naturais. Entretanto, a maioria destes materiais apresentam estabilidade mecânica e durabilidade insatisfatórias, o que constitui limitações críticas ao seu uso mais amplo, de acordo com as propriedades desejadas. Portanto, a busca por hidrogéis com propriedades aperfeiçoadas tornou-se prioritária na pesquisa em engenharia tecidual [6].

Nanocristais de celulose (CNC) constituem-se por cadeias cristalinas curtas hidrofílicas em forma de bastão, cujo comprimento varia da ordem de micro para nanômetros, com módulo de Young estimado em 138 GPa, e tensão na ruptura estimada em 7 GPa [7-11]. Desta maneira, é possível adequar as propriedades mecânicas de scaffolds de acordo com a aplicação desejada.

A gelatina metacrilato fotopolimerizável (GelMA) constitui-se por uma plataforma de hidrogel biocompatível, capaz de interagir com e encapsular células durante a fotopolimerização, possibilitando a formação de tecidos em três dimensões [5, 6]. Além disso, por ser fotopolimerizável, pode-se construir estruturas porosas em microescala de GelMA, com propriedades mecânicas ajustáveis e grande área de superfície com seguimentos carregados negativa e positivamente [6], os quais podem ser ligados aos CNC.

O objetivo do presente trabalho foi a síntese e o encapsulamento de células endoteliais humanas obtidas de cordão umbilical (HUVEC) em hidrogéis fotopolimerizáveis de GelMA incorporados com nanocristais de celulose (CNC). Espera-se desenvolver um microambiente, com propriedades mecânicas adequadas, que promova a morfogênese de redes vasculares em engenharia tecidual. Graças à possibilidade de adequar as propriedades mecânicas dos scaffolds de acordo com o desejado, pode-se desenvolver scaffolds em 3D com potencial de guiar a diferenciação de células-tronco em diferentes tecidos.

Experimental

Produção da GelMA

A GelMA foi sintetizada pela reação direta da gelatina (previamente diluída a 10% em tampão salino (PBS, pH = 7.4 durante uma hora a 50°C) com o metil acrilato em PBS a 50°C durante duas horas. Para o CNC-GelMA, os CNCs foram previamente diluídos em PBS a 1% m/m em relação à gelatina. A reação de polimerização foi interrompida pela diluição em 5 vezes do produto em PBS. A mistura foi dialisada em água deionizada (membrana de 12-14 kDa) para a remoção de impurezas de baixo peso molecular (metil acrilato livre). A diálise foi feita durante 5 dias, a 60°C. Em seguida, a solução foi liofilizada e armazenada em temperatura ambiente até o momento de utilização. O produto liofilizado final foi diluído a 5% em meio de cultura basal (EBM-2; Lonza®) a 60°C, e em seguida adicionou-se o fotoiniciador a 0,2% m/v em relação à solução GelMA + meio EBM. Manteve-se esta solução de GelMA a 37°C até o posterior encapsulamento das células.

Cultura celular e Encapsulamento

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC, Green Fluorescent Protein (GFP)-expressing) foram cultivadas em meio basal EBM-2 suplementado com bullet kit (EGM-2; Lonza®) até atingirem a confluência. Em seguida, as células foram tripsinadas, centrifugadas, e o pellet celular foi resuspendido na solução de GelMA. Para a fabricação 3D do hidrogel, 10 µL da suspensão GelMA + células foi introduzida entre dois espaçadores de 50 µm de altura, e a suspensão foi coberta com uma lamínula funcionalizada com 3-(trimethylsilyl)propyl methacrylate (TMSPMA). Em seguida, os hidrogéis foram polimerizados com as células encapsuladas por luz ultravioleta (UV) 6.9 mW/cm², 360–480 nm. O tempo de exposição à luz UV foi de 15 segundos. Os hidrogéis foram mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com bullet kit Lonza® + 10% soro fetal bovino. Após 3, 7 e 14 dias, os hidrogéis foram fixados em paraformaldeído a 4% em DPBS e coradas com DAPI

(Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Nikon TE 2000-U, Nikon, USA).

Resultados e Discussão

Encapsulamento de células

A Figura 1 mostra imagens obtidas por microscopia de contraste de fase de células HUVECs encapsuladas em hidrogéis GelMA (médio grau de metacrilatação e 0,1% de fotoiniciador) e GelMA + CNC (1%) após 1 e 7 dias de cultivo. Nota-se um ligeiro aumento no número de células nas imagens correspondente aos hidrogéis com nanocristais de celulose, contudo, deve-se averiguar se o aumento é significativo, além de comparar o alinhamento das células em ambas as amostras (indicativo do processo de vasculogênese [12]).

A Figura 2 mostra a posterior organização circular das células endoteliais após 14 dias de cultivos, resultando na formação de espaços sem células. Nota-se também um expressivo aumento das células no interior dos hidrogéis em relação aos outros períodos reportados (3 e 7 dias, Figura 1).

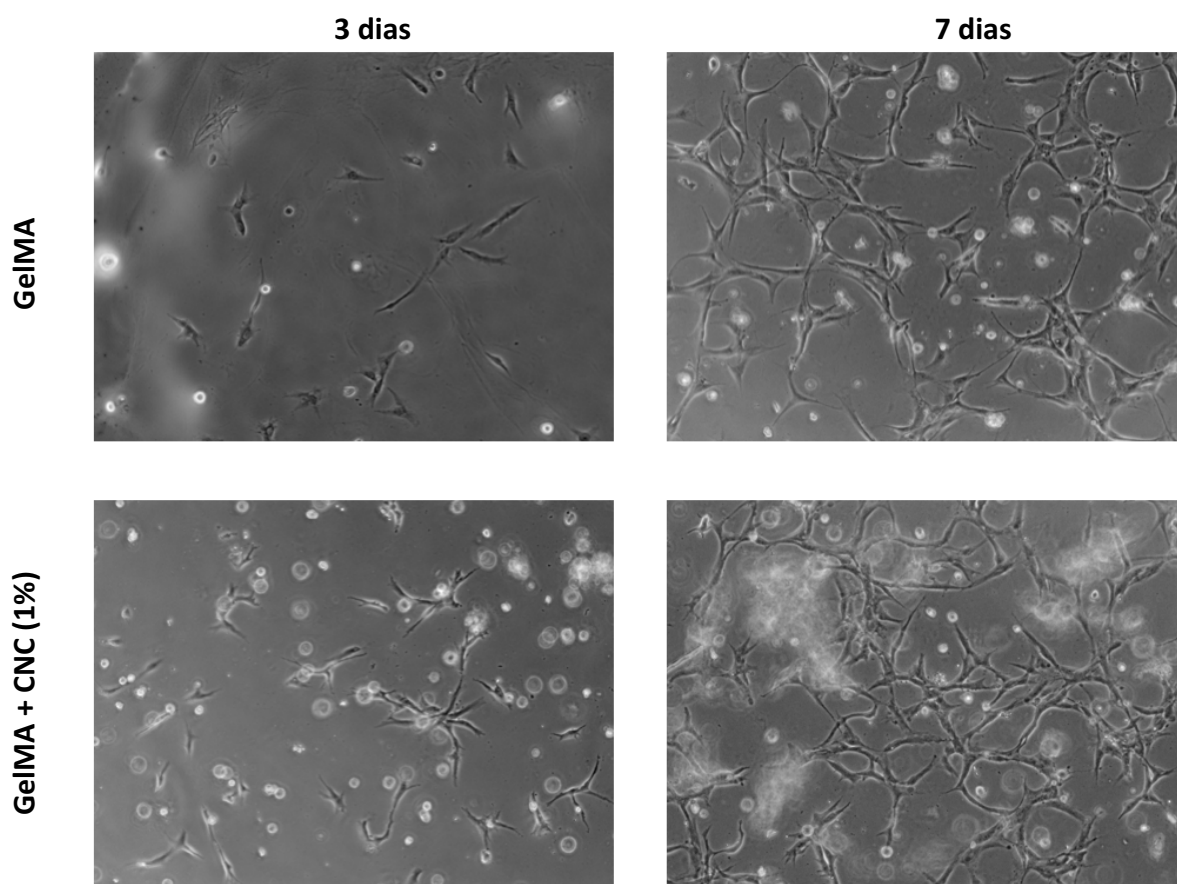


Figura 1. Encapsulamento de células HUVECs em hidrogéis de GelMA e GelMA + CNC (1 %) após 1 e 7 dias de cultivo.

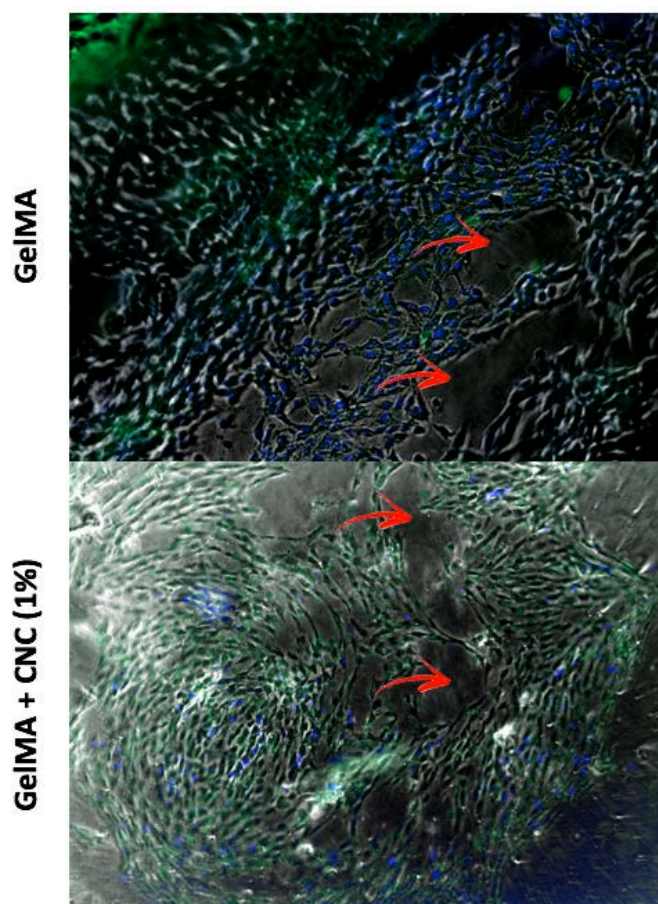


Figura 2. Imagens dos hidrogéis, obtidas por contraste de fase e de epi-fluorescência sobrepostas, após 14 dias de cultivo. O núcleo, marcado por DAPI, aparece em azul. O GFP, expresso pelas HUVEC, aparece em verde. As setas mostram os espaços sem células resultantes da organização das células endoteliais.

Conclusões

Ambos os hidrogéis suportam o encapsulamento e a organização de células endoteliais para posterior vascularização tecidual, mostrando que os CNC podem ser utilizados como reforço em compósitos com hidrogéis para aplicação em bioimpressão 3D, sendo possível modular as propriedades mecânicas de acordo com os diferentes tipos de tecido.

Referências Bibliográficas

1. R. Langer; J. Vacanti. *Science*. 1993. 260. 920.
2. P. de la Puente; D. Ludeña. *Experimental Cell Research*. 2014. 322. 1.
3. G.C. Reilly; A.J. Engler. *Journal of Biomechanics*. 2010. 4355.
4. Y. Liu, Y; J. Lim; S.-H. Teo. *Biotechnology Advances*. 2013. 31. 705.
5. L. H. Nguyen; et al. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012. 18. 363.
6. S.R. Shin; et al. *ACS Nano*. 2011. 6. 362.
7. T. Nishino; K. Takano; K. Nakamae. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1995. 33. 1647.
8. Y. Habibi; et al. *Journal of Materials Chemistry*. 2008. 18. 5002.
9. C. Xiang; Y.L. Joo; M.W. Frey. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. 2009. 3.147.
10. N. Rescignano; et al. *Carbohydrate Polymers*. 2014. 99. 47.
11. G. Siqueira; et al. *Carbohydrate Polymers*. 2013. 91. 711
12. A. Shamloo; et al. *Royal Society of Chemistry*. 2008. 8. 1292.