

BIOIMPRESSÃO 3D E CARACTERIZAÇÃO DE BIOTINTAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO HIALURÔNICO METACRILATO (AHMA)

Caio Athayde de Oliveira¹; Arthur João Reis Lima Rodvalho²; Leonardo Santana Ramos Oliveira³; Lucca Ribeiro Alves³; Willams Teles Barbosa²; Ana Paula Bispo Gonçalves⁴; Jaqueline Leite Vieira⁴; Paulo Romano Cruz Correia²; Milena Botelho Pereira Soares⁴; Josiane Dantas Viana Barbosa²

¹ Graduando em Engenharia Mecânica; Iniciação científica - CNPQ; olivathayde.jr@gmail.com

² Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; josianedantas@fieb.org.br

³ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

⁴ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Salvador-BA

RESUMO

A técnica de Bioimpressão 3D para a engenharia de tecidos vem sendo constantemente estudada e gerando resultados diferentes devido a gama de aplicabilidade da técnica. Para uso desta tecnologia, é necessário o estudo e análises de matrizes como a exemplo de hidrogéis, que são viáveis para utilização em conjunta com células para se criar a biotinta usada na bioimpressão, verificando suas propriedades físico-químicas, viabilidade celular e propriedades mecânicas para a aplicação desejada. A partir disto, o intuito deste trabalho é de analisar estas propriedades tendo como foco a matriz de ácido hialurônico (AH) em diferentes concentrações, durante a confecção da biotinta para a bioimpressão 3D para futura aplicação em engenharia de tecidos.

PALAVRAS-CHAVE: Ácido hialurônico; Bioimpressão; Biotinta, Engenharia de Tecidos.

1. INTRODUÇÃO

Na engenharia de tecidos, uma técnica que vem ganhando destaque com seus avanços recentes e diversos estudos é a implementação da bioimpressão 3D¹. Esta tecnologia permite variação de parâmetros para as mais diversas aplicações na área da saúde e da bioregeneração e mimetização de tecidos com a ajuda de hidrogéis capazes de simular um ambiente viável para as células e que possam se diferenciar em um tecido vivo. Tal técnica gera produtos dos quais precisam passar por estudos e análises, químicas, mecânicas e biológicas, para verificação de diversos aspectos para saber se a aplicação de um determinado hidrogel com células (chamado de biotinta) é compatível com o tecido que se deseja regenerar ou mimetizar, para que seja utilizado tanto os parâmetros corretos com a matéria prima correta para produção do hidrogel e da biotinta².

Na engenharia de tecidos, uma técnica que vem ganhando destaque com seus avanços recentes e diversos estudos é a implementação da bioimpressão 3D¹. Esta tecnologia permite variação de parâmetros de produção dos *scaffolds*, estruturas utilizadas para o crescimento celular, para as mais diversas aplicações na área da saúde e da medicina regenerativa. Os moldes produzidos por meio dessa técnica visam a mimetização dos tecidos, utilizando biopolímeros termoplásticos e hidrogéis capazes de simular o ambiente natural das células, para que essas possam posteriormente até se diferenciar em um tecido similar ao *in vivo*. Os materiais utilizados para a síntese dos produtos dessa técnica precisam passar por estudos e análises físico-químicas, mecânicas e biológicas, a fim de verificar diversos aspectos para saber se a aplicação de um determinado biomaterial é compatível com o tecido que se deseja regenerar ou mimetizar. Além disso, no caso dos hidrogéis utilizados para a impressão em conjunto com as células (biotintas) é necessário um rigoroso ajuste de parâmetros, para que no final se tenha um *scaffold* viável².

O ácido hialurônico (AH) vem sendo amplamente estudado devido a sua viscoelasticidade, facilidade de gelificação e suas propriedades biológicas para uma gama de aplicações na biomedicina³. Este estudo teve como objetivo produzir *scaffolds* com diferentes concentrações de HÁ por bioimpressão 3D para avaliar a printabilidade desses hidrogéis, analisando suas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas, verificando como a concentração de AH interfere nestas propriedades e na sua capacidade de produção de *scaffolds* com células viáveis para aplicação em futuros estudos de engenharia tecidual.

2. METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho foi dividida em quatro etapas: preparação do hidrogel, preparação da biotinta impressão dos *scaffolds* por bioimpressão 3D e por fim, a caracterização dos biomateriais,

O hidrogel foi preparado inicialmente utilizando o AH dissolvido em água ultrapura sob constante agitação até completa dissolução. Em seguida, foi adicionado o metacrilato na solução e o seu pH foi ajustado para 8 gotejando uma solução de 5 M NaOH. Com o pH ajustado, a solução foi deixada em um *shaker* agitando *overnight* a 4°C e retirado para lavagem com álcool etílico, com auxílio de uma centrífuga para retirar o metacrilato que não reagiu da solução. Após a lavagem, o precipitado formado foi congelado a -80 °C por no mínimo 2 horas e então levados a um liofilizador por 10 horas para finalizar a produção do AH metacrilato (AHMA).

Para confecção da biotinta, o AHMA liofilizado, foi pesado para concentrações diferentes (1,5; 3; 4,5 e 6% p/v) e dissolvido em Phosphate-Buffered Saline (PBS) em um ambiente estéril dentro de uma seringa para criar um meio compatível e viável para as células. Posteriormente, estas foram suspensas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), misturadas aos hidrogéis, dando origem as biotintas. Foi utilizado 0,05% do fotoiniciador Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) para cada concentração de biotinta e em seguida foi levado para a bioimpressão para obtenção dos *scaffolds*.

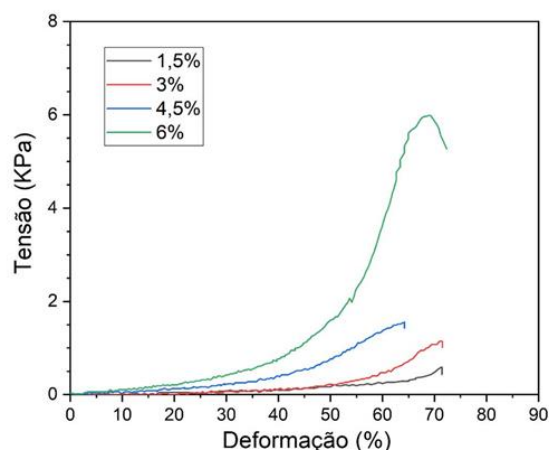
Para realizar a bioimpressão das biotintas de AHMA, a impressora utilizada neste estudo foi a Octopus da empresa 3D Biotechnology Solutions (3DBS). Foram impressos *scaffolds* cilíndricos de 13 mm de diâmetro, 4 mm de altura e 80% de preenchimento. Estes foram impressos em placas de petri e placas de 6 poços estéreis, através de uma agulha de 0,7 mm e expostos a uma luz UV por 5 minutos para fotocuração. Após o término da exposição da luz UV, os *scaffolds* foram submetidos ao teste mecânico por compressão, reológico e biológico.

Para análise mecânica, foram analisados o comportamento da curva tensão x deformação de cada *scaffold* nas diferentes concentrações, através de um texturômetro da marca Brookfield CT3 para avaliar como o aumento da concentração de AHMA pode alterar este parâmetro. Este ensaio foi realizado utilizando uma célula de carga de 1000g e 0,01 mm/s de velocidade. A análise reológica, foi realizada um reômetro da marca Haake Rheotest (Medingen 2.1) para verificar a viscosidade da biotinta com a variação de sua concentração utilizando o modelo de Ostwald-de Waele. Para análise biológica foram utilizadas 5x10⁴ células/mL células tronco murinas GFP, analisadas por microscopia 10 dias após a impressão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

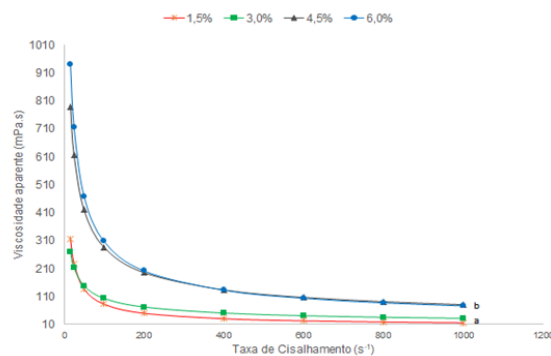
A Figura 1 mostra a curva tensão x deformação obtida pelo teste de compressão para cada *scaffold* impresso. É notório o aumento de tensão necessária para ruptura do *scaffold* com o aumento de concentração de cada AHMA feito. Desta forma, a concentração de 6% de AHMA foi a que apresentou maior valor de tensão por conta do aumento do teor de HA na formulação. Essas curvas são caracterizadas por uma região elástica linear e plástica ocasionada pelo aumento da tensão sem grande incremento na deformação.

Figura 1: Curvas de tensão x deformação dos *scaffolds* com diferentes concentrações de AHMA.



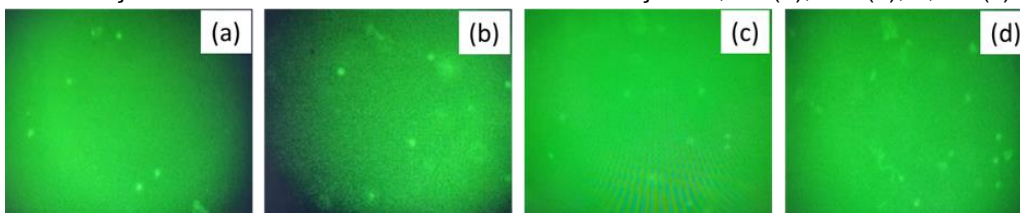
Na Figura 2 tem-se as curvas da viscosidade x taxa de cisalhamento das diferentes formulações estudadas. Nota-se que quanto maior a concentração, mais viscoso o hidrogel tende a ficar mantendo sua taxa de cisalhamento semelhante para todas as concentrações.

Figura 2: Curvas de viscosidade x taxa de cisalhamento dos hidrogéis com diferentes concentrações de AHMA.



Na Figura 3 é mostrada as células (pontos luminosos) distribuídas na biotinta, demonstrando a sua viabilidade para as concentrações de 1,5 a 6% como biotintas para aplicação na bioimpressão 3D.

Figura 3: Visualização do L929 dentro do AHMA nas concentrações 1,5% (a), 3% (b), 4,5% (c) e 6% (d).



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados gerados se mostraram favoráveis para futuros estudos acerca da viabilidade e aplicabilidade do AHMA na engenharia de tecidos, por conta do aumento da resistência por compressão e viabilidade celular em concentrações mais altas como mostrado nos resultados. A partir disto, é possível estender ainda mais o nível do estudo, aumentando tanto o número de dias para o teste biológico, quanto a concentração para encontrar um limite de viabilidade que propicie o aumento nas propriedades mecânicas, mas que não inviabilize o crescimento celular dentro da biotinta.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FIOCRUZ pela oportunidade das bolsas. Ao SENAI CIMATEC pela disponibilização da infraestrutura. E a equipe pela ajuda com a realização deste trabalho.

5. REFERÊNCIAS

- ¹CHOI, G; CHA, H.J. **Recent advances in the development of nature-derived photocrosslinkable biomaterials for 3D printing in tissue engineering.** Biomaterials Research, 2019.
- ²DING, Yan; ZHANG, Xu; MI, Chen; QI, Xin; ZHOU, Jing; WEI, Dai. **Recent advances in hyaluronic acid-based hydrogels for 3D bioprinting in tissue engineering applications.** Smart Materials in Medicine, Volume 4, pag 59-68, 2023.
- ³HACHET, Emily; BERGHE, H.V.D; BAYMA, Eric, et al. **Design of Biomimetic Cell-Interactive Substrates Using Hyaluronic Acid Hydrogels with Tunable Mechanical Properties.** Biomacromolecules 2012.