

Desenvolvimento e Biofabricação de Scaffolds Tubulares para aplicação em Engenharia de tecidos do sistema nervoso periférico.

Rebeca O. Silva; Monize Caiado Decarli; Júlia A. Nogueira; Bruna Maria Manzini; Jorge V. L. da Silva

{rebeca.silva; monize.decarli; julia.nogueira; bmanzini; jorge.silva}@cti.gov.br

**Núcleo de Tecnologias Tridimensionais – NT3D
Centro de Tecnologia e Informação Renato Archer –
CTI/Campinas/SP**

***Abstract.** This article describes the development of cylindrical scaffolds produced by 3D printing for regeneration of peripheral nervous tissue. Additive manufacturing is a technique used in tissue engineering for the production of scaffolds and related to peripheral nerve resistance. The objective of the project is to develop models of scaffolds, capable of being printed by the Fab@CTI with specific geometric dimensions parameters, which, in the future, can be used in the laboratory for tests on tissue regeneration in mice.*

***Resumo.** Este artigo descreve o desenvolvimento de scaffolds cilíndricos produzidos por impressão 3D para regeneração de tecido nervoso periférico. A manufatura aditiva é uma técnica utilizada na engenharia de tecidos para produção dos scaffolds e coligada na reparação do nervo periférico. O objetivo do projeto é desenvolver modelos de scaffolds, capazes de serem impressos pela Fab@CTI, com dimensões geométricas específicas, que após avaliação de qualidade dimensional, averiguar se podem ser utilizados em laboratório para testes na regeneração tecidual em camundongos.*

1. Introdução

A regeneração do tecido nervoso é um processo considerado difícil, pois as células são denominadas permanentes com nenhuma regeneração celular [Kumar, et. al., 2006; Otsuki, 2020]. Existem vários métodos para se tentar alcançar o reparo como: microcirurgia; enxertos heterólogos, homólogos e autólogos; próteses neurais, entre outros. [Luís, 2008; De Lacueva França, 2014; Millesi, 1986; Pereira Lopes et al., 2006; Sun et al., 2009; Assaf, et al., 2015; Sánchez, 2020]. As próteses neurais apresentaram-se como uma boa alternativa para a reparação do tecido nervoso, com objetivo de orientar e proteger o tecido a ser reparado [Pereira Lopes et al., 2006; Sun et al., 2009; Assaf, et al., 2015; Sánchez, 2020].

A engenharia tecidual disponibiliza novas alternativas para aprimorar as técnicas

de reparo do tecido nervoso. Ela se baseia em três pilares: 1) utilização de matéria viva, como células; 2) utilização de suporte tridimensional (como os *scaffolds*) e 3) fatores de crescimento [Langer; Vacanti, 1999; Sánchez, 2020].

A agregação e interação dos três componentes (célula, suporte tridimensional e fatores de crescimento), contribuem para a reconstrução do tecido nervoso que foi danificado. A aplicação da manufatura aditiva às técnicas da engenharia de tecidos possibilitam a produção de suporte tridimensional (*scaffolds*) aplicados na regeneração tecidual [Langer; Vacanti, 1999; Sánchez, 2020; Pedde et al., 2017; Dodla et al., 2019; Sánchez, 2020].

O scaffold é uma suporte tridimensional temporário que permite a adesão celular e o crescimento tecidual [Hutmacher, 2001; De Lacueva França, 2014]. Os scaffolds podem ser desenvolvidos para apresentar determinado comportamento mecânico, o que auxilia na sustentação para o crescimento do tecido. Ele também facilita a comunicação intercelular, a organização tridimensional das células, a adesão, a proliferação, a diferenciação e a migração celular [Blitterswijk et al., 2008; De Lacueva França, 2014].

Os scaffolds tubulares podem ser utilizados no reparo do tecido, ofertam orientação e proteção do nervo durante o reparo tecidual, que por sua vez, enriquece o microambiente no interior do tubo e conseqüentemente preserva as células existentes, de modo a melhorar a regeneração [Torres et al., 2003; Belkas et al., 2004; Assaf, et al., 2015].

Esses scaffolds tem como função proporcionar um canal para a difusão de fatores neurotróficos e neurotrópicos, fornecer comunicação entre as células e permitir troca de nutrientes e excreção de produtos residuais no meio envolvente. Além disso, criam suporte mecânico às fibras nervosas, direciona os axônios e proporciona resistência mecânica, elasticidade, densidade de corrente elétrica, entre outras [Johnson et al., 2008; De Ruitter et al., 2009; Assaf et al., 2015; Lemos, 2015]. Várias funções associadas ao scaffold provém, também de sua matéria prima, os biomateriais.

Os biomateriais influenciam diretamente na característica físicas e químicas da estrutura tridimensional, além de serem compatíveis ao organismo humano. Podem ser compostos de materiais naturais ou combinações de substâncias sintéticas e/ou naturais. São caracterizados por serem biocompatíveis (sua degradação dentro do corpo não gera resíduos tóxicos), podem ser biorreabsorvíveis, (a degradação dentro do corpo ocorre pela hidrólise de suas ligações éster, e assim, são completamente absorvidos pelo organismo) e biodegradáveis (seus grupos funcionais são compatíveis com a ação enzimática do organismo) [Ratner et. al, 1996; Blitterswijk et al., 2008; Maurício et al., 2011; De lacueva França, 2014]. O PCL é um exemplo de biomaterial, e amplamente utilizado em scaffolds para reconstrução de tecido nervoso. Pertence ao grupo de polímeros sintéticos e possui características favoráveis à regeneração de tecido nervoso, como a transparência, que facilita no posicionamento correto da prótese, também fornece mais resistência mecânica e estimula células de Schwann para o local lesionado [Pierucci et al., 2008; Assaf et al., 2015]

Baseado nesses fatos, foi proposto o desenvolvimento de métodos para a produção de modelos de scaffolds tubulares, de PCL, utilizando manufatura aditiva com a impressora Fab@CTI.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais utilizados para desenvolvimento e produção dos modelos.

Os scaffolds foram produzidos pela impressora 3D Fab@CTI, capaz de trabalhar com material em pó. A impressora possui um cabeçote adaptado em forma de funil, no qual o material é fundido e extrudado por uma rosca até o bico no final do tubo, com o qual é formado o filamento. A Fab@CTI com o cabeçote de extrusão foi desenvolvida no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer [Inforçatti Netto, 2013], baseada na plataforma de pesquisa do projeto open source Fab@Home da Universidade de Cornell. A impressora é monitorada pelo software Fab@Home, desenvolvido no próprio projeto [projeto Fab@Home, 2018]. O software permite determinar os parâmetros da impressão, tais como: velocidade do material depositado; altura e largura do filamento; posicionamento da mesa, entre outros. Esses parâmetros afetam diretamente a qualidade dos scaffolds impressos.

Para o desenvolvimento das geometrias foram usados os softwares Rhinoceros 5.0 e BioScaffolds [Dávila, 2015]. Os scaffolds projetados e impressos pela FAB@CTI terão como base o biomaterial PCL CAPA® 6506 fornecido pela Perstorp.

2.2 Estratégias e características dos *scaffolds* desenvolvidos.

Todos os scaffolds desenvolvidos terão uma malha de poros, os quais devem ter um tamanho de cerca de 0,1 mm, esse tamanho de poro é chamado de airgap (Ag) (figura 1C). Todos deverão possibilitar a formação de tubos com diâmetro de 0,3 mm (figura 1A e B). O objetivo de se produzir estes tubos por manufatura aditiva é que os poros sejam feitos de forma controlada.

A produção desses scaffolds apresenta desafios para que as especificações geométricas sejam atendidas, o que afeta diretamente a qualidade do scaffold impresso. Um dos desafios é a precisão de produção da máquina para atingir as dimensões necessárias. Para tentar solucionar esse problema, foram criadas diferentes geometrias, em diferentes posições de impressão, já que esses parâmetros também comprometem a qualidade do produto impresso.

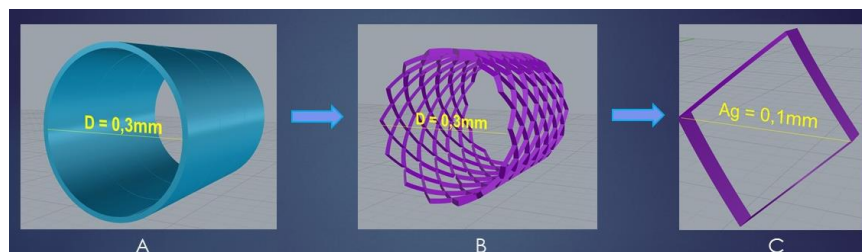


Figura 1: A. Figura ilustrativa do diâmetro equivalente a 0,3 mm do tubo. B. Ilustra o Scaffold tubular. C. Ilustrar o Ag equivalente a 0,1 mm do poro.

2.3 Desenvolvimento dos modelos de *scaffolds* (tubos porosos).

Foram criados cinco modelos: o modelo 1 foi desenvolvido com os parâmetros do programa Fab@Home, apresentando uma única camada sem poros e extremamente fina, e os poros deverão ser confeccionados manualmente após a produção da estrutura. O modelo 2 foi desenvolvido pelo software BioScaffolds, com duas camadas de filamentos finos, possibilitando também o manuseio para a formação do tubo. Este modelo proposto

foi impresso em um plano e posteriormente enrolado em forma cilíndrica. Com o software Rhinoceros foram projetados os três modelos restantes, com geometria ou técnica de impressão diferentes. Os modelos 3 e 4 consistem no mesmo conceito de modelagem (zig-zag) (figura 2), a diferença entre eles está relacionada a sua forma de impressão. O modelo 3 será impresso “deitado” e o modelo 4 será impresso em “pé” (figura 3). Para a formação do tubo será feita a junção das duas extremidades do scaffold formando um cilindro. Para finalizar, o modelo 5 será construído como um tubo por “deposição descontinuada”. Nesse modelo não é necessário fazer a junção das extremidades da malha porosa, pois o tubo é formado camada sobre camada (figura 3).

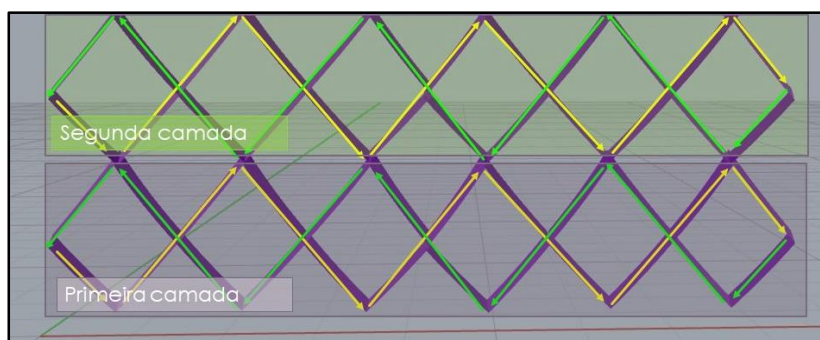


Figura 2: Ilustra a formação dos poros em (zig-zag) e como serão impressos. Setas amarelas: começo e direção da impressão. Setas verdes: retorno e direção da impressão.

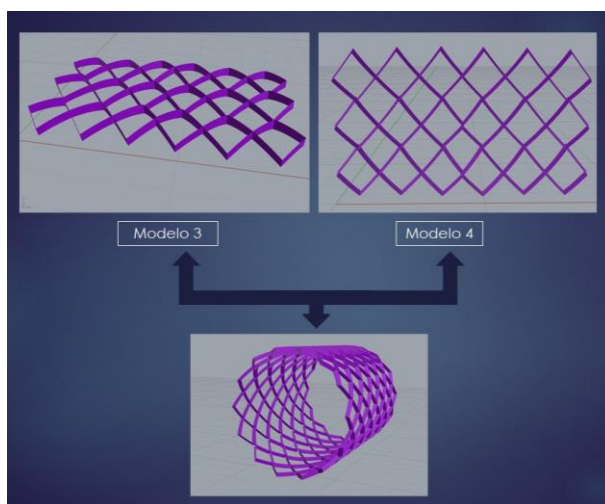


Figura 3: Ilustra o modelo 3 impresso “deitado” e o modelo 4 impresso em “pé” e posteriormente a junção de suas extremidades individualmente para formação do tubo poroso.

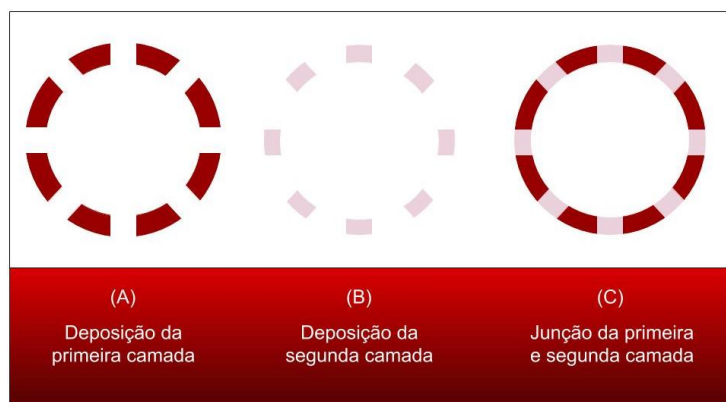


Figura 3: Ilustra o modelo que corresponde a formação do tubo e os poros.

3. Discussão

Os modelos 1 e 2 foram produzidos em laboratório, são de fácil manuseio para a formação do tubo-guia.

O modelo 1 foi desenvolvido com uma única camada fina e sem poros, a partir de um parâmetro do programa Fab@Home, que determina a distância entre a mesa e o bico de extrusão, resultando em uma camada fina e sem poros. A vantagem desse modelo é a possibilidade de formar o tubo-guia com o diâmetro requerido. Porém é preciso fazer os poros manualmente, o que prejudica a precisão do modelo e não justifica a utilização de manufatura aditiva no controle de formação dos poros.

O modelo 2 é uma malha porosa de duas camadas de filamentos. Os filamentos finos facilitam o manuseio para a formação do tubo-guia, porém a geometria não atendeu os requisitos de dimensão.

Os modelos 3, 4 e 5 foram desenvolvidos utilizando o software Rhinoceros. Os modelos 3 e 4 apresentam a mesma base geométrica em forma de “zig – zag”, porém diferentes na forma de impressão. O modelo 5 é um tubo poroso que utiliza a técnica de impressão descontinuada, na qual a posição de uma camada sempre será ao contrário da camada anterior, assim, as áreas que não foram preenchidas permitirão a formação dos poros. Esses três modelos ainda não foram produzidos em laboratório.

4. Conclusão

Os modelos, a geometria e a forma de impressão que foram desenvolvidos neste trabalho são alternativas para se produzir tubos que atendam as especificações desejadas (diâmetro do tubo de 0,3 mm e o Ag de 0,1 mm), visando a regeneração do tecido nervoso. Os modelos 1 e 2 apesar de permitirem a formação tubular da rede porosa, ainda não atendem as especificações de dimensão desejada. Infelizmente, não foi possível avaliar com clareza a eficácia da impressora Fab@CTI para a produção dos scaffolds destinados a reparação do tecido nervoso, pois é necessário realizar os teste de produção dos modelos 3, 4 e 5, para averiguar se são possíveis de produzir e se atendem às exigências dimensionais requeridas.

5. Referência

- Assaf, Kyl, et al. Reparo de nervos periféricos com a utilização de PCL e nanoestruturas de carbono. 2015.
- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res.* 26:151-60, 2004.
- Blitterswijk CV et al. *Tissue Engineering: Academic Press Series in Biomedical Engineering*, 1 ed, Elsevier, 2008.
- Dávila, J. L.; Freitas, M. S.; Inforçatti Neto, P.; Silveira, Z. C.; Silva, J.V. L.; D'ávila, M. A. Software to generate 3-D continuous printing paths for the fabrication of tissue engineering scaffolds. *International Journal, Advanced Manufacturing Technology* , v. 84, p. 1671-1677,2015.
- De Lacueva França, Miguel Alexandre. *Regeneração do Nervo Periférico-Modelo Animal na Avaliação de Biomaterias e de Terapias Celulares.* 2014.
- De Ruiter, Godard CW, et al. Designing ideal conduits for peripheral nerve repair. *Neurosurgical focus*, 26.2: E5, 2009.
- Dodla, M. C. et al. Peripheral Nerve Regeneration. In: *Principles of Regenerative Medicine.* [s.l.] Elsevier, v. 5p. 1223–1236, 2019.
- Hutmacher, Dietmar W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 12, n. 1, p. 107-124, 2001.
- Inforçatti, N. P. Estudo da viabilidade técnica e projeto de um mini-cabeçote de extrusão com rosca para impressoras tridimensionais portáteis. São Carlos: USP, Dissertação de Mestrado, 2013.
- Johnson, Elizabeth O.; Soucscos, Panayotis N. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides. *Injury*, 39.3: 30-36, 2008.
- KUMAR, Vinay et al. *Robbins e Cotran: fundamentos de patologia.* Elsevier Brasil, 2006.
- Langer, R. S.; VACANTI, J. P. Tissue engineering the challenges ahead. *Scientific American*, v. 280, p. 86-89, 1999.
- Lemos, Isabel Alexandra Fernandes. *Novas estratégias no tratamento de lesões de nervo periférico-Artigo de revisão bibliográfica.* 2015.
- Luís Al. *Reparação de lesões do nervo periférico num modelo animal.* Universidade do Porto, 2008.
- Maurício AC, Gärtner A, et al. "Cellular Systems and Biomaterials for Nerve Regeneration in Neurotmesis Injuries." *Biomaterials Applications for Nanomedicine:* 978-979, 2011.
- Millesi, H. The nerve gap. Theory and clinical practice. *Hand. Clin.*, v.2, n.4, p.651-663, 1986.
- Otsuki, Leo; BRAND, Andrea H. Quiescent neural stem cells for brain repair and regeneration: lessons from model systems. *Trends in Neurosciences*, 2020.

- Pedde, R. D. et al. Emerging Biofabrication Strategies for Engineering Complex Tissue Constructs. *Advanced Materials*, v. 29, n. 19, 2017.
- Pereira Lopes, F. R.; Campos, L. C. M.; Corrêa JR., J. D.; Balduino, A.; Lora, S.; Langone, F.; Borojevic, R.; Martinez, A. M. B. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Experimental Neurology*, v. 198, p. 457-468, 2006.
- Pierucci, A.; Duek, E. A. R.; Oliveira, A. L. R. Peripheral nerve regeneration through biodegradable conduits prepared using solvent evaporation. *Tissue Engineering*, v. 14, n. 5, p. 595-606, 2008.
- Projeto Fab@Home Disponível em: <<https://www.fabathome.net/>> acessado em julho de 2018.
- Ratner, B. R., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. Introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science*, 1996.
- Sánchez, Diego Noé Rodríguez. Conduto de orientação nervosa funcionalizado com células estromais mesenquimais multipotentes promove a regeneração do nervo isquiático em ratos. 2020.
- Sun, M.; Kingham, P. J.; Reid, A. J.; Armstrong, S. J.; Terenghi, G.; Downes, S. In vitro and in vivo testing of novel ultrathin PCL and PCL/PLA blend films as peripheral nerve conduit. *Journal of Biomedical Materials Research, parte A*, p. 1470-1481, 2009.
- Torres, M. F. P.; Graça, D. L.; Farias, E. L. P. Reparação microcirúrgica de nervo periférico por meio de sutura, cola de fibrina ou bainha de BioFill® em ratos Wistar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 5, 2003.