

**15º Congresso Brasileiro de Polímeros
27 a 31 de outubro de 2019**

BIOMATERIAL À BASE DE POLIAMIDA-6 COMO AGENTE MODULADOR DA CICATRIZAÇÃO TECIDUAL

Fernanda T. G. Dias^{1*}, Natália F. Nicoletti², Anderson R. Ingracio³, Asdrúbal Falavigna^{2,3}, Otávio Bianchi^{1,3,4}

*1 – Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais (PGMAT), Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil *ftgdias@ucs.br*

2 – Laboratório de Terapia Celular (LATEC), Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil

3 – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brasil

4- Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

Resumo:

Este trabalho investigou o potencial de um biomaterial polimérico como agente modulador da cicatrização de lesões cutâneas em ratos. A atuação deste biomaterial, uma nanomembrana de poliamida-6 quimicamente modificada com um derivado de óleo de soja (PA-6/SOMA), se concentraria no tratamento de feridas crônicas, as quais necessitam de implantes longevos e que forneçam resistência estrutural ao tecido neoformado. A estrutura e a citocompatibilidade desta nanomembrana já haviam sido reportadas. Fazia-se necessário, portanto, investigar o seu comportamento quando em contato direto com o microambiente da ferida *in vivo*, principalmente em termos de resposta inflamatória e de epitelização das lesões. As feridas nos ratos foram analisadas quanto aos aspectos morfométricos, histológicos e imunohistoquímicos. O biomaterial não provocou inflamação, nem retardou a epitelização das lesões e, quando associado à biomolécula PDGF-BB, contribuiu significativamente na fase de remodelamento cicatricial.

Palavras-chave: *poliamida-6, biomaterial, cicatrização cutânea, colágeno, ratos Wistar*

Polyamide-6 biomaterial as a modulating agent of tissue healing

Abstract:

This work investigated the potential of a polymeric biomaterial as a modulating agent of the cutaneous healing in rats. The performance of this biomaterial, a polyamide-6 nanomembrane chemically modified with a soybean oil derivative (PA-6/SOMA), would focus on the treatment of persistent skin wounds, which require permanent implants that provide resistance to the new tissue. The structure and cytocompatibility of this nanomembrane had already been reported. Therefore, it is necessary to investigate its behavior when in direct contact with an *in vivo* wound microenvironment, especially in terms of inflammatory response and epithelialization of the lesions. The animals' wounds were analyzed under morphometric, histological, and immunohistochemical aspects. The biomaterial did not provoke any inflammatory reaction or delayed epithelialization, and when associated with the biomolecule PDGF-BB, contributed significantly in the cicatricial remodeling phase.

Keywords: *polyamide-6, biomaterial, cutaneous healing, collagen, Wistar rats*

Introdução

Recentemente, o nosso grupo de pesquisa reportou o desenvolvimento de nanomembranas a base de poliamida-6 (PA-6) potencialmente aplicáveis no tratamento de feridas cutâneas [1,2]. Estas estruturas fibrosas podem ser usadas como suportes (ou *scaffolds*) na medicina regenerativa, especialmente por proverem reconhecimento biológico para os tecidos funcionais em formação. A PA-6 é um polímero biocompatível aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (EUA) para uso humano em suturas cirúrgicas, principalmente em virtude da sua semelhança estrutural com proteínas [3]. Além de boas propriedades mecânicas e superficiais, este polímero pode ter a sua degradabilidade controlada, o que justifica o seu uso em aplicações de curto ou longo prazo [4]. Enquanto a maior parte das pesquisas em biomateriais se concentra no estudo de polímeros biodegradáveis, *scaffolds* a base de PA-6 podem ser utilizados em implantes de longo prazo, destinados ao tratamento de feridas persistentes ou graves, como aquelas provenientes de úlceras diabéticas ou queimaduras de terceiro grau [5]. Neste tipo de lesão, tais materiais funcionariam como uma camada intermediária protetora entre o leito da ferida e o tecido neoformado, garantindo uma cicatrização mais eficiente. À medida que o biomaterial fosse lentamente degradado, o tecido em formação cresceria nos interstícios da estrutura nanofibrosa, atuando como uma matriz extracelular (ECM) e sendo assimilado pelo corpo [6]. Além disso, não haveria a necessidade das trocas frequentes de curativo, diminuindo-se assim o desconforto do paciente e a exposição da ferida à contaminação por patógenos externos [5].

No estudo reportado por Dias e colaboradores (2019) [2], duas nanomembranas a base de PA-6 foram desenvolvidas e testadas como *scaffolds* no tratamento tópico de lesões cutâneas: uma fabricada a partir do polímero comercial (PA-6) e a outra, produzida a partir da PA-6 quimicamente modificada com óleo de soja maleinizado (PA-6/SOMA). A microestrutura dos biomateriais eletrofiados e suas características morfológicas, superficiais e citotóxicas foram investigadas e discutidas no estudo em questão [2]. Além de ter conferido tenacidade ao polímero, a presença do óleo de soja maleinizado (SOMA) na estrutura da PA-6 também favoreceu a interação do biomaterial com um agente modulador da cicatrização tecidual. Este mediador quimiotático, o fator de crescimento derivado de plaquetas recombinante (PDGF-BB), teve sua bioatividade prolongada por até 12 hs quando associado à estas estruturas nanofibrosas. Fazia-se necessário, então, investigar o comportamento destas nanomembranas quando em contato direto com um microambiente de ferida *in vivo*. De que forma estes biomateriais afetariam a resposta inflamatória e o processo de reepitelização em um modelo animal de lesão cutânea? O objetivo do presente trabalho consistiu, portanto, em avaliar o potencial cicatrizante e de ação modulatória destas estruturas nanofibrosas em um processo de reparo tecidual *in vivo*. A ação da nanomembrana PA-6/SOMA na epitelização e na deposição de colágeno durante a cicatrização de feridas cutâneas (cirurgicamente provocadas) em ratos Wistar foi acompanhada e discutida. As feridas dos animais foram analisadas sob os aspectos morfométricos, histológicos e imunohistoquímicos transcorridos 3, 7 e 14 dias de injúria ao tecido.

Experimental

Nanomembranas eletrofiadas a base de poliamida-6 (PA-6)

As nanomembranas de poliamida-6 comercial (PA-6; M_v : 53.000 g mol^{-1}) e poliamida-6 quimicamente modificada com óleo de soja maleinizado (PA-6/SOMA; 66.000 g mol^{-1}) foram produzidas e caracterizadas por Dias e colaboradores (2019) [2]. As nanomembranas produzidas apresentaram diâmetros de 171 nm (PA-6) e 250 nm (PA-6/SOMA), compatíveis com o ambiente tissular, no qual o diâmetro das fibras de colágeno variam de 50 – 500 nm.

Ensaio in vivo (modelo animal)

Modelo de lesão cutânea

Ratos Wistar (*rattus norvegicus albinus*) machos provenientes do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, foram utilizados para a realização do modelo de lesão cutânea. Duas feridas circulares de 1 cm de diâmetro foram feitas no dorso de cada animal usando um *punch* estéril até a exposição da fáscia. Uma das feridas representou o controle (ferida não tratada) e a outra foi tratada com o biomaterial (nanomembranas de PA-6 ou PA-6/SOMA) não suturado à pele e impregnado ou não com PDGF-BB (N = 6 animais/grupo; Total N = 36). As feridas foram observadas macroscopicamente ao longo de 14 dias. O conteúdo celular em uma das nanomembranas de PA-6/SOMA foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV), após a sua remoção do dorso de um dos animais (N = 1) no 3º dia pós-operatório.

Análise morfológica

As lesões cutâneas foram avaliadas macroscopicamente e fotografadas com uma câmera digital (Fujifilm FinePix HS10) (abertura de lente de 35 mm e distância entre lentes de 27,5 cm) nos dias zero (tempo de lesão), 3º, 7º e 14º. A área das lesões foi determinada por meio do software Image J-Pro Plus 4,0 (Media Cybernetics L.P), o que permitiu o cálculo da taxa de contração da área da ferida (C); onde $C = [A_0 \text{ (dia do pós-operatório)}] - [A_{14} \text{ (lesão no 14º dia)}]$.

Análise histológica

Após os 14 dias de *follow-up*, amostras do centro das lesões cutâneas foram coletadas, fixadas em formaldeído e analisadas histologicamente. Secções seriadas de 5 µm foram coradas com hematoxilina e eosina e os cortes foram avaliados quanto à presença ou ausência de inflamação e reepitelização em um microscópio óptico Leica DM2500 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EUA). A presença de fibras de colágeno e de tecido de granulação foi investigada por meio da coloração de tricromo de Masson.

Análise Imuno-histoquímica

Esta técnica foi utilizada na quantificação da expressão de colágeno tipos I e III no modelo animal de lesão cutânea. A imunodeteção foi realizada em cortes de tecido de parafina (3 µm de espessura), a partir de anticorpos específicos [7]. As imagens capturadas em magnificação de 200x foram analisadas por meio do software Image NIH Image J 1.36b (NIH, Bethesda, MD, EUA). A imunopositividade do colágeno foi quantificada com base na cor do pixel por meio de uma macro específica criada para cada amostra.

Resultados e Discussão

A Fig. 1 mostra um esquema representativo dos principais resultados obtidos no modelo animal de cicatrização. Na Fig. 1(a), pode-se observar as micrografias de FEG-MEV das superfícies das nanomembranas PA-6/SOMA, removidas diretamente do leito da ferida após 72 h de aplicação. Os eventos biológicos de proliferação celular e formação de matriz extracelular (ECM) e fibras de colágeno puderam ser detectados nas imagens microscópicas, os quais foram mais expressivos para o biomaterial associado ao PDGF-BB. A ECM e o colágeno conferem resistência ao tecido histológico lesado e suas presenças estão diretamente relacionadas ao processo de cicatrização. A Fig. 1(b) mostra a histologia do tecido lesionado após 14 dias de contato com o biomaterial PA-6/SOMA e comprova que a presença da nanomembrana não provocou reação inflamatória local. A presença do biomaterial no leito da ferida, apesar de ser uma barreira física ao processo cicatricial, não prejudicou a epitelização das lesões [Fig. 1(c)]. Os resultados de imuno-histoquímica [Fig. 1(c)] também comprovaram o remodelamento cicatricial que ocorre após o 10º dia de lesão, no qual o colágeno tipo

III é gradualmente substituído pelo colágeno tipo I. Esta troca de tipos de colágenos está associada ao aumento da estabilidade mecânica do tecido neoformado e da sua resistência à contração excessiva pelos miofibroblastos [8]. A Fig. 2 mostra a evolução da cicatrização das lesões nos dias 0, 3^o, 7^o e 14^o de pós-operatório e seus aspectos morfométricos.

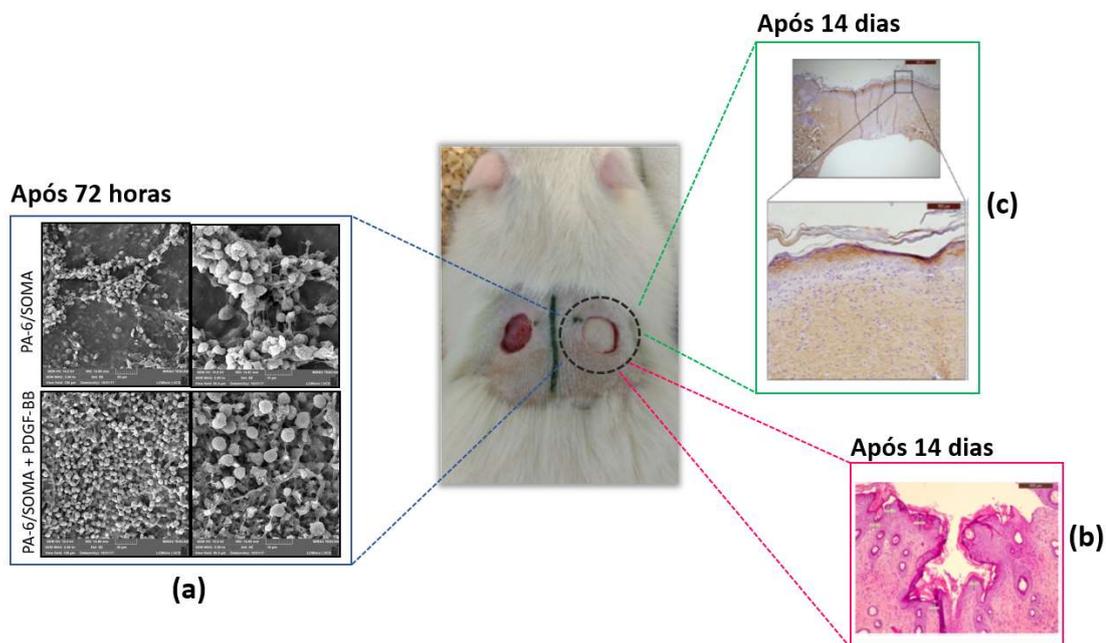


Figura 1: Principais resultados obtidos para o biomaterial PA-6/SOMA no modelo animal de cicatrização: (a) FEG-MEV da superfície da nanomembrana após 3 dias de contato com o leito da ferida, (b) histologia da lesão e (c) imuno-histoquímica para a determinação da expressão de colágeno.

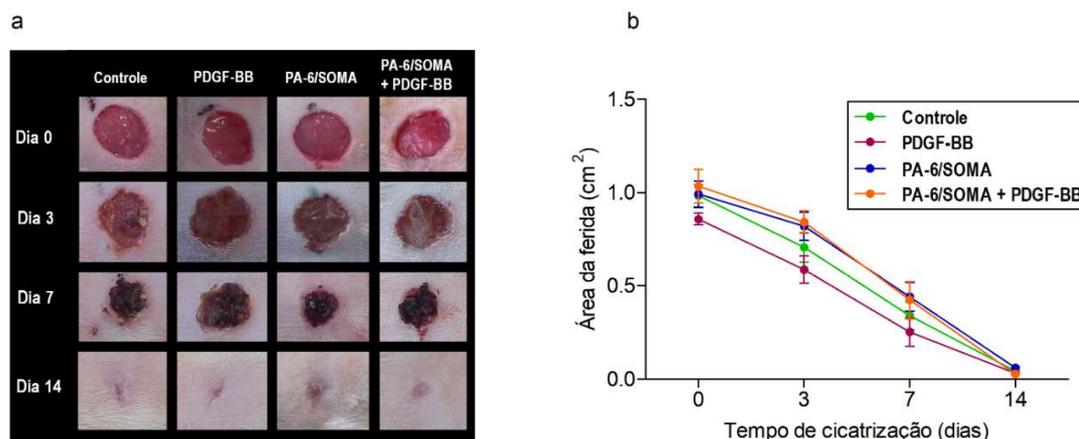


Figura 2: Evolução da cicatrização cutânea *in vivo* até 14 dias após o ferimento

Nas feridas em que a PA-6/SOMA foi aplicada, observou-se a formação de uma crosta aderida em torno e sobre esta, comportando-se a nanomembrana então como um tecido interfacial, posteriormente englobado pelo tecido de granulação recém-formado [Fig. 2(a)]. O biomaterial não sofreu degradação ao longo dos 14 dias de cicatrização, oferecendo suporte mecânico ao tecido em crescimento. Em relação à taxa de contração das feridas, não foram observadas diferenças significativas entre os animais que não receberam tratamento (controle) e aqueles tratados apenas com PDGF-BB ou com a PA-6/SOMA em associação [Fig. 2(b)]. Em 7 dias pós-procedimento, uma melhora acentuada no aspecto das lesões foi observada e, ao final dos 14 dias, as feridas estavam completamente cicatrizadas. Isto confirma o potencial do biomaterial como um veículo carreador de

biomoléculas ativas para a administração tópica, oferecendo proteção e estendendo a bioatividade destas substâncias no local da ferida.

Conclusões

Este trabalho investigou o papel de uma nanomembrana eletrofiada a base PA-6 no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wistar. A microestrutura e as características morfológicas, superficiais e citotóxicas do biomaterial PA-6/SOMA, um *scaffold* produzido a partir da poliamida-6 modificada quimicamente com um derivado de óleo de soja (SOMA), já haviam sido anteriormente reportadas. Além de atuar como veículo na proteção e no carregamento de moléculas biológicas, a nanomembrana PA-6/SOMA forneceu o suporte estrutural necessário para os eventos celulares intrínsecos ao processo de regeneração tecidual. Apesar de não ter acelerado a taxa de cicatrização, a presença desta nanoestrutura no leito da ferida não provocou reação inflamatória local, nem prejudicou a epitelização das lesões. Para as feridas tratadas com a PA-6/SOMA em associação ao fator de crescimento PDGF-BB, observou-se uma menor deposição de colágeno tipo III, o que comprova a participação do biomaterial na fase de remodelamento cicatricial. Para se inferir sobre a qualidade e a funcionalidade do tecido neo-formado, as expressões de colágenos tipo I e III, colagenase e elastina estão sendo investigadas por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) em tempo real.

Agradecimentos

Os autores agradecem à empresa *Mantoflex Indústria de Plásticos Ltda.* pela doação do polímero e à *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo suporte financeiro.

Referências

- [1] F.T.G. Dias; N.F. Nicoletti; D.R. Marinowic; M. Figueiró; A. Ingracio; J. Catafesta; J.C. da Costa; A. Falavigna; O. Bianchi in *Anais do 14º Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia, 2017*, Vol. 1, p. 1311.
- [2] F.T.G. Dias; A.I. Ingracio; N.F. Nicoletti; F.C. Menezes; L. Dall Agnol; D.R. Marinowic; R.M.D. Soares; J.C. da Costa; A. Falavigna; O. Bianchi *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019, 99, 957.
- [3] M.F. Maitz *Biosurface and Biotribology*, 2015, 1, 161.
- [4] K.A. Rieger; N.P. Birch; J.D. Schiffman *J. Mater. Chem. B*, 2013, 1, 4531.
- [5] A. Aurora; A. Beasy; J.A. Rizzo; K.K. Chung *J. Burn Care Res.*, 2018, 39, 593.
- [6] S. Canonico; F. Campitiello; A. Della Corte; V. Padovano; G. Pellino in *Skin Grafts*, M. Gore Ed.; IntechOpen, 2013, 51–76.
- [7] M. Peletti-Figueiró; I.S. Aguiar; S. Paesi; D.C. Machado; S. Echeverrigaray; M. Roesch-Ely; A. Falavigna; J.A.P. Henriques *Columna/Columna*, 2017, 16, 43.
- [8] P. Martin; W.R. Teodoro; A.P. Velosa; J. Morais; S. Carrasco; R.B. Christmann; C. Goldenstein-Schainberg; E.R. Parra; M.L. Katayama; M.N. Sotto; V.L. Capelozzi; N.H. Yoshinari *Autoimmun Rev.*, 2012, 11, 827.