

CARACTERIZAÇÃO DE VASOS SANGUÍNEOS ARTIFICIAIS DE CELULOSE BACTERIANA

F. P. ROTUNNO¹, G. COLLA¹ e L. M. PORTO¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina,
Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: {fernandarotunno, guilherme_colla, luismar}@intelab.ufsc.br

RESUMO – O desenvolvimento de *scaffolds* para a engenharia de tecidos vem ganhando importância à medida que novos dispositivos celularizados tem sido eficientemente testados e validados tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Atualmente, um dos maiores desafios da engenharia de tecidos e da engenharia de órgãos é a disponibilização de vasos sanguíneos artificiais que possam mimetizar vasos sanguíneos nativos com sucesso. Esses dispositivos podem ser utilizados para validar experimentos relacionados à resposta a novos medicamentos e para o desenvolvimento de vasos sanguíneos para implantes (*bypass*), entre outros. O objetivo desse trabalho é biossintetizar vasos sanguíneos artificiais de celulose bacteriana, produzida pela bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, e testar suas características funcionais e estruturais. A observação por MEV mostrou uma membrana constituída de fibras densas formadas na interface com o ar (interior do vaso), seguida por uma superfície porosa (exterior do vaso). O ensaio à tração mostrou uma tensão de ruptura comparável a de um vaso sanguíneo humano. Dessa forma, esse estudo apresenta um biomaterial com potenciais aplicações na engenharia de tecidos como um modelo de vasos sanguíneos.

1. INTRODUÇÃO

Doenças vasculares ateroscleróticas ainda são as maiores causas de morte nas sociedades ocidentais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o número de vítimas chega a 17,3 milhões de pessoas por ano (Mendis *et al.*, 2011). Mais de 600.000 procedimentos cirúrgicos são feitos a cada ano pelo Mundo utilizando enxertos vasculares de até 6 mm de diâmetro. Ainda que vasos autólogos continuem sendo os mais usados, parte dos pacientes não possui vasos apropriados devido a doenças vasculares, amputação, entre outros motivos. Além disso, para fazer o enxerto é necessário fazer um segundo procedimento cirúrgico, o que pode aumentar os riscos para o paciente (Schermer *et al.*, 2014).

Vasos sanguíneos artificiais produzidos a partir de diversos materiais já vêm sendo testados com o objetivo de substituir o uso de enxertos, como é o caso do ácido hialurônico esterificado (Remuzzi *et al.*, 2004), de uma matriz extracelular natural de membrana amniótica (Lee *et al.*, 2012) e da fibroína de seda (Zhang *et al.*, 2009), por exemplo. Vasos de celulose bacteriana de até 1 mm de diâmetro já estão sendo usados em microcirurgias, tanto como capa protetora para suturas de micronervos quanto na forma de modelo prático para o treinamento de suturas (Klemm *et al.*, 2001).

A celulose bacteriana (CB) é produzida em forma de fibra por algumas bactérias do gênero *Gluconacetobacter* quando cultivadas em um meio de cultura com fontes de carbono e nitrogênio (Brown *et al.*, 1976). A *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente *Acetobacter xylinum*) é uma bactéria Gram-negativa capaz de polimerizar cadeias lineares de β -1,4-glucana que são então secretadas para o exterior da célula (Czaja e Krystynowic, 2006). A CB sintetizada pela *G. xylinus* apresenta diversas características únicas, como alta biocompatibilidade, alta permeabilidade e capacidade de retenção de água e resistência mecânica (Klemm *et al.*, 2005). Esse tipo de celulose é idêntico à celulose de origem vegetal em termos de estrutura molecular. No entanto, a celulose bacteriana é livre de lignina, pectina e hemicelulose. Esse biomaterial possui várias aplicações no campo biomédico (Czaja *et al.*, 2007), como pele artificial, curativo, vasos sanguíneos artificiais, dispositivos para a engenharia de tecidos (Gao *et al.*, 2011), entre outras.

As características citadas anteriormente indicam que a celulose bacteriana é um biomaterial com grande potencial para aplicação na engenharia de tecido vascular. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é biossintetizar vasos de hidrogel de celulose bacteriana com 4 mm de diâmetro, utilizando a bactéria *G. xylinus*, e testar suas características funcionais e estruturais.

2. METODOLOGIA

2.1. Produção do inóculo

Foram colocados 80 mL de meio Hestrin & Schramm (HS) em um Erlenmeyer de 100 mL previamente autoclavado e tampado com uma bucha estéril. Em seguida, foram adicionados 20 mL de inóculo *G. xylinus*. Após a reativação da bactéria, o inóculo foi mantido por um período de quatro dias para posterior utilização.

2.2. Produção dos vasos

Em um frasco *schott* estéril foi colocado o meio HS, inoculado com 20% *G. xylinus*, totalizando 400 mL. A suspensão foi então transferida a um Erlenmeyer estéril de 500 mL, com uma mangueira de silicone de 4 mm de diâmetro externo colocada dentro dele. Com uma bucha estéril, essa mangueira foi fixada de forma que ficasse submersa no meio sem entrar em contato com as paredes ou com o fundo do recipiente. A mangueira foi conectada a uma bomba de circulação de ar e, dessa forma, a membrana foi produzida em torno da mangueira devido à porosidade do silicone. Utilizando esse método, o vaso foi biossintetizado por um período de 12 dias. O silicone foi retirado do interior do vaso, a membrana foi limpa com NaOH 0,1 M, seu pH foi estabilizado e, por fim, ela foi esterilizada.

2.3. Caracterização estrutural dos vasos

Os vasos de celulose bacteriana foram liofilizados (-80 °C, por 24 h) antes de serem submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no Laboratório Central de Microscopia (LCME) utilizando-se o equipamento JEOL JSM – 6390LV.

2.4. Caracterização funcional dos vasos

Os vasos de celulose bacteriana foram submetidos a um ensaio à tração utilizando o texturômetro *Stable Micro Systems*. Foram realizadas cinco repetições de cada amostra, de dimensões: 50 mm de comprimento e diâmetro de 4 mm. A espessura obtida dos biofilmes foi $1,2 \pm 0,3$ mm, considerando-se a média de cinco medidas repetidas aleatoriamente. A separação inicial entre as garras e a velocidade do teste foi de 40 mm e $0,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, quando cultivada em meio de cultura HS em condições estáticas de cultura, produz membranas de celulose na interface líquido/ar. Essa membrana é formada por um grande número de camadas de celulose finas e cresce em espessura para dentro do meio líquido (Borzani e Souza, 1995). Os vasos de CB produzidos neste trabalho apresentaram as dimensões de 10 cm de comprimento, 4 mm de diâmetro e $1,2 \pm 0,3$ mm de espessura.

As amostras liofilizadas foram caracterizadas quanto à sua microestrutura, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A microestrutura da membrana de celulose bacteriana obtida através do corte transversal da amostra indica que a superfície do interior do vaso, parte que fica na interface com o ar proveniente do bombeamento, apresenta alta densidade de nanofibras de celulose, enquanto que a superfície do exterior do vaso, parte que fica na interface com o meio de cultura HS, é caracterizada por uma rede de nanofibras com baixa densidade, conforme mostra a Figura 1.

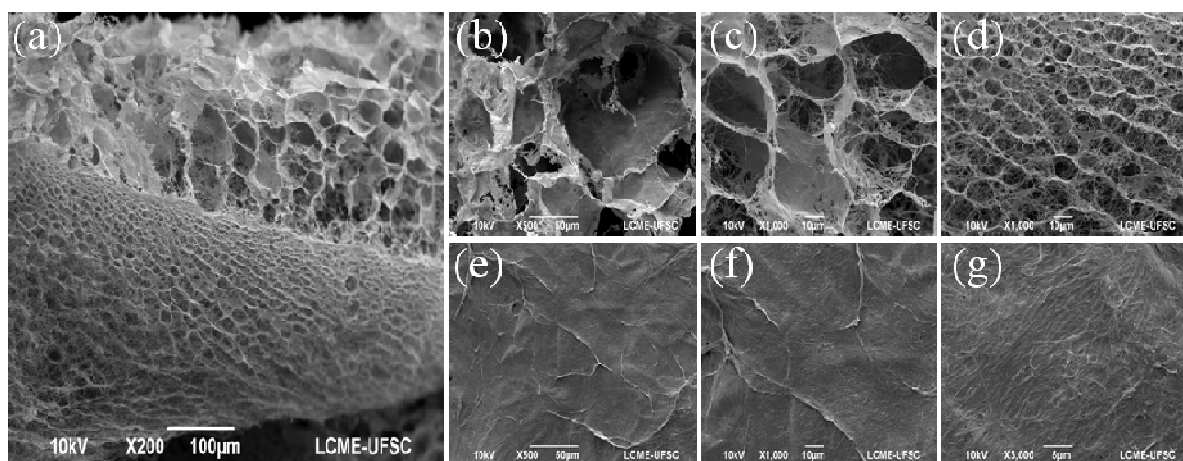


Figura 1 – (a) Membrana de celulose bacteriana formada por superfície porosa seguida por uma superfície densa. (b), (c) e (d) mostram detalhes da superfície porosa; (e), (f) e (g) mostram detalhes da superfície densa.

Os vasos de celulose bacteriana foram submetidos a ensaios mecânicos enquanto estavam no estado hidratado para verificar a tensão de ruptura, o módulo de elasticidade de Young e o alongamento relativo sob tensão antes da ruptura. O resultado do ensaio à tração pode ser observado na Figura 2, que mostra uma curva típica de tensão-deformação para os vasos quando expostos a uma tensão.

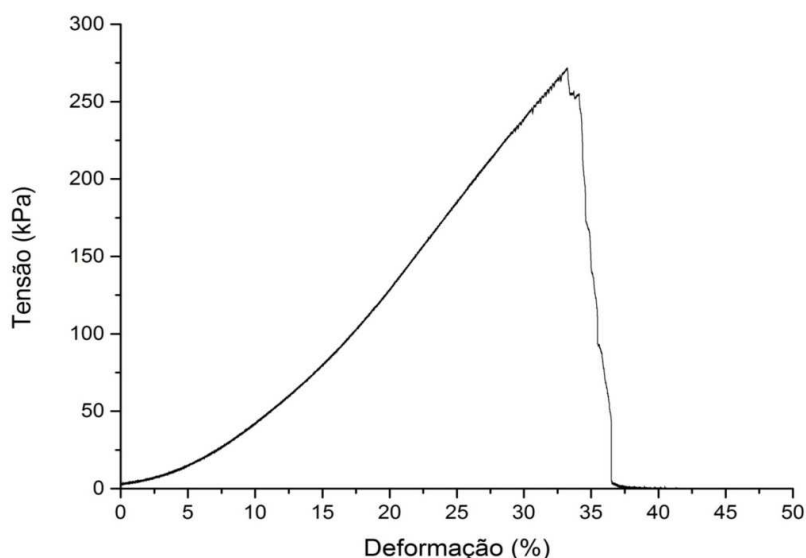


Figura 2: Curva de tensão *versus* deformação do vaso de celulose bacteriana hidratado.

O valor da tensão de ruptura da celulose bacteriana enquanto estava em forma tubular e hidratada se mostrou superior aos valores disponíveis na literatura tanto para a veia safena (Roeder *et al.*, 1999) quanto para a artéria carótida (Latimer *et al.*, 2013). O módulo de elasticidade de Young obtido, que indica a rigidez do material, foi inferior ao módulo de elasticidade da safena e da carótida, como pode ser observado na Tabela 1. Ainda assim, esse biomaterial é resistente e capaz de suportar a pressão arterial à qual seria submetido.

Tabela 1 – Comparação entre os dados obtidos com o ensaio à tração e os dados da literatura referentes à veia safena e à artéria carótida

	Tensão de Ruptura (kPa)	Módulo de Elasticidade (kPa)
Vaso de CB	229 ± 38	10,46 ± 0,63
Veia Safena	131	550
Artéria Carótida	56,4	40

4. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a viabilidade de produção de vasos artificiais de celulose bacteriana de pequeno calibre, material de grande demanda para a substituição de vasos coronários. Foram produzidos e caracterizados vasos artificiais de 4 mm de diâmetro e até 15 cm de comprimento. O biomaterial produzido é resistente, capaz de suportar a pressão arterial coronariana, e pode ser potencialmente utilizado como substituto de veias safenas e artérias mamárias em cirurgias de *bypass*, visando à revascularização do miocárdio, assim como substituição de outros vasos sanguíneos. O método de produção desenvolvido permite a construção de vasos de diâmetro e espessura variáveis.

5. REFERÊNCIAS

- BORZANI, W.; SOUZA, S. Mechanism of the film thickness increasing during the bacterial production of cellulose on non-agitated liquid media. *Biotechnol. Lett.*, v. 17, n. 11, p. 1271-1272, 1995/11/01 1995.
- BROWN JR., R.M.; WILLISON, J.H.M.; RICHARDSON, C.L. "Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*". *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, p. 4565 – 4569, 1976.
- CZAJA, W.; KRYSTYNOWICZ, A. "Microbial cellulose - the natural power to heal wounds". *Biomaterials*, p. 145-151, 2006.
- CZAJA, W.K.; YOUNG, D.J.; KAWECKI, M.; BROWN, R.M. "The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications." *Biomacromolecules*, p. 1–12, 2007.
- GAO, C.A.; WAN, Y.Z.; YANG, C.X.; DAI, K.R.; TANG, T.T.; LUO, H.L. "Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold." *J. Porous. Mat.*, p. 139–145, 2011.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.P.; BOHN, A. "Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material." *Angewandte Chemie International Edition*, p. 3358–3393, 2005.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. "Bacterial synthesized cellulose – artificial blood vessels for microsurgery". *Prog. Polym. Sci.*, p. 1561-1603, 2001.
- LATIMER, C.A.; NELSON, M.; MOORE, C.; M.; MARTIN, K.E. "Effect of collagen and elastin content on the burst pressure of human blood vessel seals formed with a bipolar tissue sealing system". *J. Surg. Res.*, p. 1 -8. 2013.
- LEE, P.H.; TSAI, S.H.; KUO, L.; HWANG, C.Y.; KUO, C.Y.; YANG, V. C.; CHEN, J.K. "A prototype tissue engineered blood vessel using amniotic membrane as scaffold". *Acta. Biomater.* 2012.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control Geneva: World Health Organization*, 2011.

REMUZZI, A.; MANTERO, S.; COLOMBO, M.; MORIGI, M.; BINDA, E.; CAMOZZI, D.; IMBERTI, B. "Vascular smooth muscle cells on hyaluronic acid: culture and mechanical characterization of an engineered vascular construct". *Tissue. Eng.*, v.10, n.5-6, p.699-710. 2004.

ROEDER, R.; WOLFE, J.; LIANAKIS, N.; HINSON, T.; GEDDES, L. A.; OBERMILLER, J. "Compliance, elastic modulus, and burst pressure of small-intestine submucosa (SIS), small-diameter vascular grafts". *J. Biomed. Mater. Res.*, v.47, n.1, p.65-70. 1999.

SCHERNER, M.; REUTTER, S.; KLEMM, D.; STERNET-KOCK, A.; GUSCHLBAUER, M.; RICHTER, T.; LANGEBAEELS, G.; MADERSHAHIAN, N.; WAHLERS, T.; WIPPERMANN, J. "In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept?" *J. Surg. Res.*, 2014.

ZHANG, X.; WANG, X.; KESHAV, V.; WANG, X.; JOHANAS, J. T.; LEISK, G. G.; KAPLAN, D. L. "Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts". *Biomaterials*, v.30, n.19, p.3213-3223. 2009.