JULIO CESAR CAMPOS BISSOLI

**Produção de matrizes sintéticas acelulares por
eletrofiação para aplicações em urologia**

Tese apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de
São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Homero
Bruschini

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bissoli, Julio Cesar Campos

Produção de matrizes sintéticas acelulares por eletrofiação para aplicações em urologia / Julio Cesar Campos Bissoli -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientador: Homero Bruschini.

Descritores: 1.Matriz extracelular 2.Engenharia tecidual 3.Polímeros
4.Prolapso de órgão pélvico 5.Células-tronco 6.Telas cirúrgica

USP/FM/DBD-209/17

DEDICATÓRIA

Dedico

*A Milene, Melissa e Dudu.
Minha família querida.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Homero Bruschini, meu paciente e polido orientador, Chefe da Disciplina de Urologia do HCFMUSP, pela idealização do projeto e sagacidade em concatenar as condições para sua execução no Brasil e em Sheffield, permitindo a realização de meu Doutorado Sanduíche e todas as outras boas coisas que surgiram após em minha vida.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, professor titular da disciplina de Urologia do HCFMUSP e mentor, por ter me ensinado a dar importância aos detalhes e sempre ter esperança. Por ter viabilizado meus projetos de estudos no exterior financeiramente e academicamente. Pelo apoio logo que retornei ao Brasil e pelo reconhecimento e confiança em mim.

À Faculdade de Medicina da USP, Casa de Arnaldo, que abrigou meus anos de formação médica, residência e pós-graduação, por todo o conhecimento que aqui recebi e pelas pessoas maravilhosas que passaram a fazer parte da minha vida desde que entrei por suas portas em 2000.

Ao CNPq e ao Programa Ciência Sem Fronteiras pela oportunidade de trazer conhecimentos novos para o nosso país.

Ao meu pai Julio Bissoli e mãe Neide Bissoli, que permitiram direta ou indiretamente minha formação e toda a sólida base que tive para iniciar meus caminhos.

Ao Prof. Luiz Alberto Feijó Junior, físico empreendedor e observador, fico grato pela confiança (e fornecimento de suas fontes de alta tensão!) desde o primeiro momento e pelas correções de conceitos e ensinamentos nessa área que tanto

permeou meus estudos.

A Enga. Helena Oyama, engenheira chefe do laboratório de biomateriais do Incor, por ceder seu tempo e espaço para longas discussões sobre como implementaríamos nossa eletrofiação com os recursos que dispúnhamos e que foram sendo adquiridos ao longo de todo o projeto, até culminarmos com nossa configuração funcionante.

Ao Prof. Christopher Chapple, comunicador brilhante e trabalhador tenaz, por ter me ensinado a importância dos relacionamentos e ter me permitido a experiência de ser pesquisador no Reino Unido sob sua tutela.

A Prof. Sheila MacNeil, pesquisadora incansável e exigente, por ter tantas e tantas vezes ter realizado reuniões e atualizações sempre buscando evoluir nos nossos projetos e idéias.

Ao Dr. Anthony Bullock, pesquisador completo e pragmático, pelos inúmeros experimentos realizados e enorme experiência transmitida com apenas um interesse, ciência.

Ao Dr. Nadir Osman, amigo e colega urologista, por ter me introduzido ao novo mundo da pesquisa e ter disposição e paciência nas minhas primeiras incursões em Sheffield.

A Dra. Giulia Gigliobianco, amiga italiana leitora contumaz e excelente cozinheira, pelos jantares e livros emprestados ao longo de nossa jornada de experimentos.

Dra. Gwendolen Reilly, pela confiança e ensinamentos no campo de engenharia de materiais e propriedades biomecânicas, ainda me lembro de ser apenas um de dois pesquisadores a ser autorizado a utilizar seu tensiômetro.

Dr. Frazer Bye, amigo químico tímido e genial, pelas discussões multidisciplinares em altíssimo nível e ensinamentos profundos. Lembro-me dos projetos (três, quatro simultâneos!) megalomaniacos e das patentes possíveis em cada um deles.

Ao Dr. Farshid Sefat, colega de microscopia eletrônica, muçulmano calmo que me ensinou muito de sua cultura durante intermináveis sessões de fotos.

Ao Dr. Sabiniano Román, melhor amigo do laboratório e com tremenda experiência a despeito de pouca idade, obrigado pelos divertidos momentos e infindáveis sessões de experimentos. Foram inúmeros cafês que tomamos enquanto conversávamos observando a neve cair.

“Where is the Life we have lost in living?

Where is the wisdom we have lost in knowledge?

Where is the knowledge we have lost in information?”

Thomas Stearns Eliot (1888-1965)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	18
3. MÉTODOS	20
3.1 Desenvolvimento do novo método de produção de matrizes por eletrofiação .	21
3.2 Avaliação das Matrizes Produzidas com Fibras Randômicas e Híbridas.....	26
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura	26
3.2.2 Medida de Densidade média das matrizes	26
3.2.3 Testes biomecânicos uniaxiais das matrizes	26
3.2.4 Testes de biocompatibilidade com implantação e cultivo de células nas matrizes	27
3.2.5 Teste de atividade metabólica das células implantadas	28
3.2.6 Propriedades mecânicas das matrizes frente a teste de degradação das matrizes em meio de cultura em até 90 dias	28
3.2.7 Produção de matrizes sintéticas no Brasil.....	29
3.3 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	32

4.1 Produção de Matrizes PLLA alinhadas e híbridas alinhadas/randômicas por eletrofiação	32
4.2 Imagens de Microscopia de Varredura	33
4.3 Densidade das matrizes	35
4.4 Propriedades mecânicas das matrizes randômicas e híbridas	37
4.5 Atividade metabólica nas matrizes randômicas e híbridas	43
4.6 Propriedades mecânicas das matrizes randômicas e híbridas após 90 dias de exposição a meio de cultura	45
4.7 Matrizes produzidas no Brasil	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO	56
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	60

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Å – Ångström

ADSC – Adipose-derived Stem Cells

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

cm – centímetro

CO₂ – gás carbônico

CTDA – células-tronco derivadas de adipócitos

DCM – diclorometano

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO – dimetil sulfóxido

EPM – erro padrão da média

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

h - hora

IUE – incontinência urinária de esforço

Kv – quilovolts

m – metro

mL – mililitro

mm – milímetros

mm/seg – milímetros por segundo

MPa – mega Pascal

N – Newton

N/m² – Newtons por milímetro quadrado, Pascals

NS – não significante

nm – nanômetros

°C – graus Celsius

OH – álcool etílico

PBS – *Phosphate buffered saline* (solução salina tamponada de fosfato)

PCL – policaprolactona

PGA – ácido poliglicólico

PHBV – poli-hidroxibutirato co-valerato

PLA – ácido polilático

PLLA – ácido polilático levógeno ou ácido poli-L-lático

PU – poliuretano

RPM – rotações por minuto

SiS – *small intestine submucosa* (submucosa de intestino delgado)

Tg – temperatura de transição vítrea

UK – *United Kingdom* (Reino Unido)

USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

v – volts

µg/mL – micrograma por mililitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de curva tensão-deformação e cálculo do Módulo de Young.....	11
Figura 2. Propriedades ideais de matrizes acelulares.....	12
Figura 3. Diagrama representando configuração clássica para produção de matrizes randômicas de PLA.....	22
Figura 4. Diagrama representando configuração 6:4 criada para produção de matrizes híbridas de PLA	25
Figura 5. Diagrama representando configuração 12:12 criada para produção de matrizes híbridas de PLA	25
Figura 6. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA randômicas	33
Figura 7. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbrido 6:4.....	34
Figura 8. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbrido 12:12.....	34
Figura 9. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA alinhadas	35
Figura 10. Densidade de 5 tipos de matrizes de PLLA.....	36
Figura 11. Propriedades biomecânicas de 5 tipos de configurações de PLLA.....	38
Figura 12. Propriedades biomecânicas de PLLA randômico e PLLA híbrido (12:12)	41
Figura 13. Atividade metabólica dosada por Alamar Blue® em 7 e 14 dias de cultura para matrizes de PLLA randômicas e híbridas	44

Figura 14. Propriedades mecânicas do PLLA randômico e PLLA híbrido tratadas ou não com álcool, nos dias 0, 14, 30 e 90 mantidos em ambiente estéril em meio de cultura	46
Figura 15. Imagens em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbridas brasileiras equivalentes a matrizes 12:12.....	48
Figura 16. Imagens em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbridas brasileiras equivalentes a matrizes randômicas de PLA.	49
Figura 17. Mecanismo proposto para explicar queda de propriedades mecânicas após 14, 30 e 90 dias em meio de cultura.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das telas de acordo com sua porosidade e trama	5
Tabela 2 - Módulo elástico, elongação máxima e tensão máxima em mulheres sadias e com prolapso	14
Tabela 3 - Tipos de matrizes produzidas e suas espessuras médias com EPM respectivo	32
Tabela 4 - Estatística descritiva das densidades das fibras.	36
Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores de Deformação na Tensão Máxima pré cultura de células.....	39
Tabela 6 - Estatística descritiva dos valores de Módulo de Young pré cultura de células	39
Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores de Tensão Máxima pré cultura de células. ..	40
Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores de Deformação na Tensão Máxima pós cultura de células.....	42
Tabela 9 - Estatística descritiva dos valores de Módulo de Young pós cultura de células	42
Tabela 10 - Estatística descritiva dos valores de Tensão Máxima pós cultura de células.	43
Tabela 11 - Estatística descritiva dos valores de atividade metabólica dosada por Alamar Blue®	44
Tabela 12 - Estatística descritiva dos valores de propriedades biomecânicas do PLLA randômico e híbrido em até 90 dias em meio de cultura	47

RESUMO

Bissoli JCC. Produção de matrizes sintéticas por eletrofiação para aplicações em urologia [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2017.

Introdução: O uso de telas de polipropileno para reforço em cirurgias para correção de prolapso vaginal apresenta taxas de complicação de até 25%. Trata-se de doença de alta prevalência, acometendo até 30% das mulheres, cujas opções atuais de tratamento foram reduzidas após a descontinuação da fabricação dos reforços tradicionais por diversos fabricantes. Uma alternativa é a utilização de matrizes sintéticas de outros materiais e com outras configurações, possibilitando inclusive cultura de células em seu leito. A eletrofiação possibilita a produção e reprodução em larga escala dessas matrizes a partir de polímeros solúveis expostos a um campo elétrico.

Objetivos: Estabelecer parâmetros de produção de matrizes com fibras híbridas e randômicas através de eletrofiação, demonstrar sua reprodutibilidade e implantar tal tecnologia em solo brasileiro. Testar as seguintes características teóricas das matrizes híbridas produzidas com ácido polilático (PLLA): maior força tênsil nos testes biomecânicos e biocompatibilidade mantida para cultura celular. Estudar a influência da cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (CTDA) sobre as propriedades mecânicas das matrizes estudadas. Avaliar a

influência da hidrólise na perda de força tênsil das matrizes em experimentos de até 90 dias.

Métodos: Foram produzidas matrizes de PLLA dissolvidos em diclorometano (DCM) nas configurações de fibras randômicas, alinhadas e um novo método foi desenvolvido para produção de matrizes híbridas. Foram realizados microscopia eletrônica, testes biomecânicos, testes de atividade metabólica e biocompatibilidade com cultivo de células-tronco derivadas de adipócitos, além de testes de degradação em meio de cultura por 90 dias para comparar as matrizes. Análise de variância (ANOVA) com teste de Tukey foram utilizados para comparação dos resultados obtidos nos experimentos quando aplicáveis.

Resultados: A produção de matrizes híbridas foi possível ajustando-se os parâmetros de eletrofiação. Imagens de microscopia comprovaram o alinhamento e hibridização das fibras. Testes uniaxiais mostraram que as matrizes híbridas foram 3 a 4 vezes mais resistentes a tração do que as matrizes randômicas ($p < 0,0001$) preservando sua biocompatibilidade e afinidade celular. A incorporação de células às matrizes híbridas e o experimento de degradação mostraram quedas nas propriedades mecânicas de força tênsil máxima das matrizes híbridas a partir de 14 dias em meio de cultura, mas sempre se mantendo acima das propriedades dos tecidos nativos pelo período estudado de até 90 dias.

Conclusões: Foi possível o desenvolvimento de nova técnica de eletrofiação para produção de matrizes híbridas de fibras alinhadas e randômicas com maior força tênsil, ainda sim mantendo sua afinidade celular. Tais matrizes enfraqueceram no período de 90 dias estudado, sem contudo apresentar valores abaixo dos fisiológicos, mostrando-se como opção promissora para substituição de telas de

polipropileno em clínica. Estudos com animais são necessários para confirmar essa hipótese.

Descritores: matriz extracelular; engenharia tecidual, polímeros, prolapso de órgão pélvico, células-tronco, telas cirúrgicas

SUMMARY

Bissoli JCC. Bioengineering production of extracellular matrices for urologic applications [thesis]. São Paulo. Medical School. University of São Paulo; 2017.

Introduction: Traditional reinforcement techniques for pelvic organ prolapse use mainly polypropylene meshes with complication rates up to 25%. It is a common disease with prevalence up to 30%, with reduced options of treatment after withdrawing of major companies from this market. An alternative is the use of synthetic matrices from other materials with other configurations, possibly with cell culture added. Electrospinning is a reproducible technique that uses solved polymers exposed to intense electric field to produce sheets like that.

Objectives: Establish parameters to electrospin hybrid and random fibres and setup this technology in Brazil. Prove following theoretical characteristics of hybrid poly-L-lactide (PLLA) matrices: higher tensile strength in biomechanical tests with comparable biocompatibility. Study adipose derived stem cells (ADSC) culture impact over biomechanical properties of these matrices. Check hydrolysis influences on tensile strength up to 90 days.

Methods: PLLA solved in dichloromethane (DCM) was electrospun in random fibres, align fibres and a novel method was developed to produce hybrid fibres. Electron microscopy (SEM), biomechanical tests, metabolic activity and biocompatibility with adipose-derived stem cells and additionally, degradation test

up to 90 days in culture medium were performed to compare matrices. ANOVA with Tukey test of differences was used to compare experiment results.

Results: The production of hybrid matrices was possible adjusting electrospinning parameters, SEM confirmed fibre's alignment and hybridization, uniaxial tests showed that hybrid matrices were 3 to 4 times stronger than random ones ($p < 0,0001$) maintaining its biocompatibility and cell affinity. Both cell incorporation to hybrid matrices and degradation experiment showed mechanical properties drop (ultimate tensile strength) after 14 days in culture medium but always keeping it above physiologic range up to 90 days studied.

Conclusions: Development of new technique of electrospinning of hybrid matrices of align and random fibres was possible, with higher tensile strength and keeping the same cell affinity. These matrices showed drop in mechanical strength along 90 days of study but always above the natural tissues range being a promising option to polypropylene meshes in clinic. Further studies with animals are needed to confirm this hypothesis.

Keywords: extracellular matrix, tissue engineering, polymers, pelvic organ prolapse, stem cells, surgical meshes

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O prolapso genital é uma doença comum cuja prevalência em mulheres assintomáticas chega a até 37% (1) representando um risco estimado de necessidade de intervenção até os 80 anos de idade de 11 a 20% (2,3) e taxas de reoperação por recorrência dos sintomas ao redor de 30% (4). O prolapso acontece quando algum órgão pélvico hernia para a vagina a partir da distância de 1cm do hímen ou através dele (5), afetando tecidos de suporte do assoalho pélvico. Pode ocorrer em diferentes compartimentos vaginais: anterior (cistocele), médio (apical) e posterior (retocele).

As taxas de falha de tratamento podem chegar até 56% (6) e por esse motivo foram sugeridos materiais de reforço na reconstrução das paredes vaginais. Com base no sucesso das telas inabsorvíveis de polipropileno como reforço no tratamento de hérnias inguinais e incisionais e na experiência com telas de polipropileno para tratamento de incontinência urinária de esforço (IUE) com taxas de sucesso superiores da 90% (7), os cirurgiões passaram a utilizar estas telas como reforço do assoalho pélvico, sem comprovação de sua completa segurança e eficácia. Baseados apenas na similaridade com os procedimentos prévios (8, 9), o primeiro kit para tratamento de incontinência urinária foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América) em 1996 e o primeiro kit para tratamento de prolapso vaginal em 2002 (10). Estudos de longo prazo mostraram taxas de extrusão/erosão de telas para tratamento de IUE da ordem de 4% (11), e complicações no uso de telas para prolapso da ordem de até 25% (12). Em 2008 e em 2011 o FDA lançou avisos de advertência relacionados ao uso de telas em cirurgias de prolapso (13,14). Desde então surgiram problemas médico

legais envolvendo uso de telas, particularmente nos EUA, levando grandes fabricantes a retirarem seus produtos do mercado americano (9).

Como alternativa, foram testados materiais absorvíveis: fâscia lata, derme acelular, telas de Vicryl® e submucosa intestinal porcina. Os três primeiros apresentaram resultados negativos no médio prazo, ao redor de 2 anos, com taxas de sucesso iguais as da cirurgia clássica sem reforço algum. Os materiais estudados teriam uma tendência a serem remodelados e reabsorvidos antes de promover um reforço tecidual adequado (15–17). Já a submucosa intestinal porcina apresentou resultados satisfatórios em termos de cura objetiva de prolapso (86% vs. 59%) porém com intensa resposta inflamatória e dor crônica pélvica em 30%-60% dos pacientes impedindo a disseminação de seu uso (18,19). Uma metanálise de 2016 confirmou que técnicas tradicionais sem reforço tem resultado semelhantes a técnicas com reforço absorvível e que as taxas de falha terapêutica são altas (38%) em ambas as técnicas. Técnicas que utilizam reforços inabsorvíveis apresentam melhores resultados (até 80% de sucesso) porém com mais complicações e maiores taxas de reoperação (até 18%) (20).

Uma vez que os resultados não são plenamente satisfatórios com as técnicas e os materiais clássicos e após a retirada do mercado das telas inabsorvíveis, abriu-se campo na bioengenharia para o desenvolvimento de novos materiais.

No Brasil, estudos iniciais foram feitos com biopolímeros derivados de celulose produzida a partir de melaço de cana de açúcar por bactérias do gênero *Zoogloea sp.* Utilizados em ratas como potenciais substitutos de defeitos de parede (21), slings (22), substitutos de alças intestinais na ampliação vesical (23) e como

agentes de preenchimento para tratamento de refluxo (24), tiveram biocompatibilidade demonstrada mas ainda não foram utilizados na prática clínica.

As telas convencionais são um tipo de matriz sintética em que suas fibras apresentam um padrão organizado de entrelaçamento. Amid et. al em 1997 classificou as telas de acordo com sua porosidade e estrutura dos seus filamentos (Tabela 1, (25)). Essa classificação é capaz de prever complicações e aplicações para cada tipo de tela, uma vez que maiores poros permitem maior infiltração de colágeno, vasos sanguíneos, fibroblastos e células imunes aumentando sua resistência a infecção e biocompatibilidade (26), enquanto fibras multifilamentares (com espaços entre os microfilamentos que compõem os fios da trama menores do que 10 μm) e microporos são menos suscetíveis a infiltração por células (especialmente macrófagos e linfócitos)(27).

Essa diferença nas taxas de infecções acontece porque bactérias podem colonizar espaços menores que 10 μm que são inacessíveis para a maioria das células imunes (9-20 μm) (28). Baseado nesse conceito, em teoria, uma tela sintética ideal seria monofilamentar com macroporos ou do tipo I (27–29). Estudos prévios com telas do tipo II, III e IV para prolapso/IUE mostraram taxas proibitivas de complicações, com erosão/infecção ao redor de 20-30% (27,30,31).

Tabela 1 - Classificação das telas de acordo com sua porosidade e trama, modificado de Amid *et. al.* (25).

Tipo	Porosidade	Trama	Tamanho dos Poros
I	Macroporosa	Monofilamentar	$> 75 \mu\text{m}$
II	Microporosa	Multifilamentar	$< 10 \mu\text{m}$
III	Macroporosa ou Microporosa	Multifilamentar	Variável
IV	Nanoporosa (Submicrônica)		$< 1 \mu\text{m}$

Existem muitos métodos para a fabricação de matrizes sintéticas com alta porosidade, incluindo sistemas auto-organizados (32), separação de fase, moldação por evaporação, moldação por derretimento, lixiviação de sal, injeção de gás e liofilização (33). Porém, todos os métodos acima apresentam dificuldades de reprodutibilidade e controle de características como diâmetro de fibras, tamanho de poros, geometria dos poros e orientação de fibras (33). Uma alternativa capaz de contornar tais dificuldades é a eletrofiação.

A eletrofiação é um fenômeno físico observado quando uma solução de um polímero com alta viscosidade é exposta a um intenso campo elétrico em um recipiente onde o líquido é extruído de maneira lenta por um pequeno ou múltiplos orifícios (do inglês *spinneret*). Usualmente tal solução é composta por um polímero de alto peso molecular e alta viscosidade em um solvente com uma pressão de vapor muito alta (*i. e.*, capaz de evaporar facilmente em temperatura ambiente), além de

baixa condutividade e alta constante dielétrica (*i. e.*, alta resistência a estresse antes que ocorra seu rompimento e possibilidade de passagem de corrente elétrica).

Apesar da relativa alta viscosidade do material empregado, ao se expor o mesmo a um campo elétrico de elevada intensidade gerado a partir da aplicação de alta tensão ocorre um fenômeno mecânico de rompimento de sua tensão superficial (usualmente na ponta de uma agulha romba). Este rompimento da tensão superficial cria uma região de instabilidade que provoca o esticamento da solução viscosa em direção a um cilindro de coleta de material aterrado, paralelamente às linhas de força do campo elétrico, fazendo com que a mesma adquira dimensões de escala micro/nanométrica em seu diâmetro. Tais fibras finas tornam-se secas após evaporação de seu solvente no caminho até o coletor de metal aterrado.

Tal processo é conhecido desde o início do século retrasado sendo observado inicialmente em 1897 por Rayleigh, detalhado por Zeleny (1914) e patenteado a partir de 1934 por Formhals para produção de fibras têxteis sintéticas. Taylor, em seus estudos sobre eletrostática (1969) descreveu os jatos produzidos pela técnica (que hoje levam seu nome, cone de Taylor), mas a eletrofiação como aplicação biomédica ganhou interesse apenas a partir da década de 90 justamente por permitir a produção de matrizes acelulares com a regulação de seus poros, tamanho de fibras, geometria de poros e orientação de suas fibras, tornando-se desde então o método de produção dentre os mais comuns para aplicações de bioengenharia (34).

Os parâmetros que controlam o processo de eletrofiação são classicamente divididos em propriedades da solução, variáveis controláveis e parâmetros ambientais (35). As propriedades da solução incluem viscosidade, tensão superficial, condutividade e peso molecular (todas dependentes entre si e variáveis com o binômio solvente/polímero utilizado), enquanto variáveis controláveis são a

taxa de fluxo, intensidade do campo elétrico, distância coletor até ponta de agulha, desenho da agulha/orifício e composição/geometria do coletor. Parâmetros ambientais são temperatura, umidade e velocidade do ar (36). De todas as variáveis apresentadas, geralmente a que tem maior impacto na morfologia das fibras obtidas é a concentração da solução, que em última instância determina sua viscosidade e tensão superficial.

Adicionalmente a todas as variáveis na produção de matrizes por eletrofiação, existe a possibilidade ou não da realização de tratamento térmico (recozimento, do inglês *annealing*) para maior uniformização das matrizes e melhora de suas propriedades mecânicas (particularmente a força tênsil máxima e o Módulo de Young). Uma das teorias a respeito da inconsistência entre diferentes matrizes produzidas por eletrofiação baseia-se na maneira aleatória em que as fibras se entrelaçam durante seu voo até o coletor. A medida que o solvente evapora no caminho, as cadeias de polímeros começam a perder a habilidade de se moverem ao redor de si mesmas e permanecem sobre altos níveis de tensão de cisalhamento (37). Como resultado, as cadeias de polímeros podem terminar em uma conformação instável.

O objetivo do tratamento térmico é aumentar a temperatura do polímero da matriz acima de sua temperatura de transição vítrea - T_g (*i. e.* temperatura na qual os polímeros assumem um estado borrachoso e suas cadeias conseguem deslizar umas sobre as outras podendo ser orientadas mediante aplicação de uma força, em temperatura sempre inferior a temperatura de fusão, T_f) e permitir que as cadeias de polímeros relaxem aumentando sua estabilidade e consistência de propriedades mecânicas em processo similar a aplicação de um ferro de passar sobre uma matriz de polímeros de celulose (algodão) (38).

Polímeros são grandes moléculas produzidas pela repetição de várias subunidades chamadas monômeros e dependendo do número de tipos de unidades repetidas, polímeros podem ser classificados como homopolímeros ou copolímeros. Seu nome deriva do grego *polus* (*i. e.* muitos) e *meros* (*i. e.* partes), e suas características físicas são dependentes do tamanho e comprimento de sua cadeia. Normalmente polímeros de cadeia mais longa apresentam maior viscosidade, maior força e rigidez além de um maior tempo de degradação, sendo um jeito comum de se reportar a um polímero fazer alusões ao tamanho de sua cadeia em termos de peso molecular (descritos por meio de sua distribuição – mínimo, máximo e médio valor). Podem ser classificados como naturais ou sintéticos e ainda subclassificados com absorvíveis ou inabsorvíveis. Para aplicações em engenharia de tecidos (bioengenharia) são características necessárias a não-toxicidade (direta e de seus subprodutos de metabolismo), não-imunogenicidade, não-carcinogenicidade e biocompatibilidade (capacidade de integração nos tecidos vivos). Características desejáveis são a resistência a infecção, baixo custo, a possibilidade de fabricação e armazenamento, absorção/degradação em tempo suficiente para repopulação e integração por células de tecido-alvo e propriedades mecânicas compatíveis com a função do tecido-alvo desde o implante, durante a repopulação até sua reabsorção completa (Figura 1) (9). Cabe ressaltar que para cada tecido-alvo as propriedades mecânicas desejadas são diferentes. Para cada polímero utilizado no implante, a queda de suas propriedades mecânicas ocorrerá proporcionalmente a medida que ocorrer sua reabsorção e, portanto, dependerá de sua velocidade de degradação e de sua micro/nanoestrutura. Idealmente, é desejável que tais características (tempo de absorção e tensão máxima) do implante e do tecido-alvo sejam conhecidas previamente e ajustadas

(se possível) de acordo com o esperado para o polímero naquele novo microambiente.

Dentre os polímeros mais comuns feitos através de eletrofiação encontramos o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli-hidroxibutirato co-valerato (PHBV), policaprolactona (PCL), quitosan, colágeno e os poliuretanos (PU).

Poliésteres alifáticos como policaprolactona, ácido poliglicólico e ácido polilático são materiais conhecidos e extensamente investigados na área biomédica desde a década de 1960 por sua biocompatibilidade. São degradados por hidrólise e enzimas em subprodutos não tóxicos como água e gás carbônico sendo, portanto, biodegradáveis e atóxicos; possuem propriedades como módulo elástico e tensão máxima altas com pequena elongação (considerados polímeros duros), portanto ótimos candidatos a componentes de matrizes acelulares para engenharia tecidual (39). Polihidroxialcanoatos como o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), (PHBV) têm ganhado interesse recente por sua resistência a hidrólise e aplicações como plásticos biodegradáveis e biocompatíveis, assim como os poliuretanos (PU) em suas aplicações como borracha sintética há mais de 30 anos, também resistentes à hidrólise e adicionalmente à calcificação. Ambos apresentam mais longa absorção quando comparados aos poliésteres sendo o PU conhecido por sua grande capacidade de deformação elástica e grande elongação.

Não existem protocolos padrão para realização de testes biomecânicos de tecidos vaginais, sendo as melhores metodologias envolvendo esses tecidos derivadas de testes uniaxiais de elongação (*i. e.* testes realizados em uma só direção), medindo em um tensiômetro as curvas de tensão-deformação. Apesar de testes multiaxiais ou biaxiais potencialmente refletirem um modelo mais próximo

do que realmente se deseja elucidar em uma deformação de amostra submetida a tração, eles são mais complexos, demandam aparelhos e softwares especiais e não são difundidos na literatura dificultando sua padronização diferentemente dos uniaxiais (que, mesmo sendo mais simples, ainda assim possuem falta de padronização) (40). Resumidamente, o teste compreende a prensão da amostra em dois pontos com distância entre eles previamente aferida e sua distensão uniaxial a uma velocidade constante até sua ruptura. A tensão é calculada dividindo-se a carga aplicada a amostra (em Newtons, N) pela área de secção transversa da mesma, sendo expressa em N/m^2 (Pascals), enquanto que a deformação da amostra é calculada dividindo-se a elongação da amostra (em metros, m) pela distância inicial medida entre as pinças da amostra. Normalmente tais dados são plotados em gráfico e mostram uma porção inicial linear na qual a tensão é diretamente proporcional à elongação respeitando a lei de Hooke, em que as deformações da amostra são ainda reversíveis ou elásticas, uma região de platô (onde as deformações da amostra são irreversíveis ou plásticas) seguida por um ponto de inflexão da curva (a tensão máxima da amostra) na qual também se define a elongação máxima da amostra. As medidas descritas podem ser observadas na Figura 2 abaixo, o módulo elástico ou Módulo de Young obtém-se do cálculo da inclinação da porção linear da curva e é inversamente proporcional à elasticidade da amostra.

Figura 1. Exemplo de curva tensão-deformação e cálculo do Módulo de Young

Para o desenvolvimento de um substituto ideal para um tecido alvo, o conhecimento das propriedades a serem mimetizadas é muito importante, e poucos estudos na literatura reportaram previamente valores medidos de propriedades biomecânicas de tecidos humanos. A maioria deles não normalizou seus dados para a área de secção transversa, exibindo seus dados em apenas Newtons, o que impede comparações posteriores (9,41,42).

Figura 2. Propriedades ideais de matrizes acelulares (Adaptado de Osman *et. al.*

(43))

Choe *et. al.* comparou faixas de fâscia lata, derme humana, fâscia do músculo reto abdominal e mucosa vaginal medindo 2 x 5 cm (medida comumente utilizada nas cirurgias com enxerto (44)) em mulheres que sofreram cirurgias por várias razões (41) mostrando que a fâscia lata teve a maior resistência máxima (217 N), seguidas pela derme humana (122 N) e fâscia do reto/mucosa vaginal (ambos com 42 N), porém não normalizando os dados para a secção transversal dos tecidos estudados (fâscia lata > derme humana > fâscia do reto e mucosa vaginal).

Lei *et. al.* analisou 43 mulheres submetidas a histerectomia por diversas razões e categorizou as mesmas em grupos pré e pós menopausa com e sem prolapso, realizando testes uniaxiais em tecidos de 5 mm x 25 mm e traçando as curvas

tensão-deformação em amostras de tecido vaginal estabelecendo os valores nativos máximo (tecidos pré menopausa) e mínimos (tecidos pós menopausa) obtendo valores de elongação máxima e módulo elástico utilizados como referência na maior parte das publicações do gênero (inclusive nas figuras utilizadas nesse texto), por terem sido normalizadas para secção transversal das amostras e comprimento inicial das amostras (45). O estudo confirmou que mulheres pós menopausa têm valores inferiores de distensão máxima e elongação máxima (mulheres saudáveis foram 22% menos resistentes a elongação e exibiram rupturas com forças 88% mais fracas após a menopausa) e maiores valores de módulo elástico (foram 64% menos elásticas) diferenças ainda mais exacerbadas na presença de prolapso (Tabela 2). Como crítica ao trabalho cabe salientar que tais amostras foram restritas a porções vaginais em torno do colo do útero (retiradas na histerectomia) e não dos ligamentos suspensores do útero ou paredes vaginais anteriores/posteriores onde normalmente se observam as fraquezas no prolapso genital.

Não conhecemos exatamente qual é a demanda em Newtons para um assoalho pélvico sadio, mas foram estimadas as forças que agem sobre ele como sendo ao redor de 2,2 a 13,4 N/cm dependendo se a mulher está em pé sem esforço ou com alguma forma de esforço abdominal (46). Em contrapartida, a fâscia do reto abdominal pode sustentar uma carga de 16 N/cm enquanto permite uma deformação de 25% no seu eixo vertical (47).

Convém enfatizar que a força tênsil sozinha não é capaz de prever sucesso em cirurgia reconstrutiva urogenital uma vez que mesmo a fâscia lata e a derme acelular que apresentaram perfis muito fortes de força tênsil máxima mostraram também taxas muito altas de recidiva em cirurgia para incontinência em 2 anos (16,17) demonstrando que para materiais biocompatíveis absorvíveis o

remodelamento promovido pelo enxerto no hospedeiro é fundamental e de maior importância para o sucesso terapêutico do que a força tênsil do material implantado isoladamente (42).

Tabela 2 - Módulo elástico, elongação máxima e tensão máxima em mulheres sadias e com prolapso (adaptado de Lei. *et. al.*).

	Controle pré-menopausa	Prolapso pré-menopausa	Controle pós-menopausa	Prolapso pós-menopausa
Módulo Elástico (MPa; média±EPM)	6.65±1.48	9.45±0.70	10.26±1.10	12.10±1.10
Elongação Máxima (média±EPM)	1.68±0.11	1.50±0.02	1.37±0.04	1.14±0.06
Tensão máxima (MPa; média±EPM)	0.79±0.05	0.60±0.02	0.42±0.03	0.27±0.03

Ainda não dispomos de um substituto com as características de tecido nativo em termos de resistência e flexibilidade, mas os dados de literatura (11,12,13,14) são claros em demonstrar que não estamos próximos de encontrar o substituto para tecidos paravaginais enfraquecidos, notadamente potenciais substitutos para matrizes sintéticas de polipropileno usadas hoje para incontinência urinária de esforço e prolapso genital, que mostram-se eficientes do ponto de vista do reforço mas com perfil de complicações que chegam a ser proibitivas no caso do tratamento de prolapso. Tais complicações têm múltiplos fatores associados, mas propriedades do polipropileno relacionadas a alta resistência, inflexibilidade e inelasticidade

certamente tem seu papel – com o agravante de telas terem a tendência de se contrair após o implante, a despeito de serem considerados biocompatíveis (9).

Nesse contexto de diminuição de produtos no mercado, erosões/extrusões detectadas com as atuais telas de polipropileno, respostas inflamatórias exacerbadas no uso de submucosa intestinal porcina e falhas terapêuticas observadas com enxertos alógenos de derme/fáscia lata e telas de Vicryl®, foi proposta a criação de matrizes acelulares visando chegar ao substituto próximo do ideal de tecido paravaginal – ao menos do ponto de vista teórico. Tal feito, baseando-se nas características físicas de elasticidade e tensão máxima, tem importância prática e com aplicações quase que imediatas em clínica e motiva diversos grupos a estudarem potenciais candidatos à substituição dos tratamentos vigentes com reforços urogenitais.

Motivado pelo desafio de encontrar substitutos biocompatíveis às telas de polipropileno, um projeto de doutorado foi criado e um estágio de doutorado sanduíche foi solicitado junto à Universidade de Sheffield onde encontra-se notório centro europeu de engenharia de tecidos e pesquisas prévias têm sido realizadas com o mesmo objetivo.

Estudo prévio na Universidade de Sheffield (48) comparou potenciais candidatos para reforços em cirurgias para prolapso e incontinência (LifeCell Alloderm® – *i. e.* derme humana decelularizada comercial, derme cadavérica, polipropileno, derme porcina, rúmen de ovelha – *i. e.* parte inicial do estômago dos ruminantes, Cook SurgiSiS® – *i. e.* submucosa de intestino delgado porcina comercial e ácido polilático eletrofiado) a matrizes acelulares para substituição de tecidos humanos periuretrais visando tratar incontinência urinária de esforço/prolapso genital e potenciais candidatos a tecidos de revestimento para

substituição de pele/epitélio mucoso. Tal estudo determinou o ácido polilático levógeno (PLLA) em microfibras fabricadas por eletrofiação como candidato ideal para fabricação de matrizes acelulares como substituto desses tecidos, devido a suas propriedades mecânicas (Módulo de Young, tensão máxima de tração e deformação na tensão máxima) próximas aos tecidos de colágeno, características de melhor infiltração celular (medidas em termos de atividades metabólica após semeadura de células), menor tempo de absorção (necessárias a formação de barreira celular e resistência até infiltração e remodelamento), baixo preço, natureza sintética e biocompatibilidade (PLLA eletrofiado foi demonstrado ainda ser encontrado intacto depois de 12 meses de implantação em ratos (49)). Tais linha de pesquisa era interessante, porém naquele momento tinha limitações como força tênsil limítrofe em relação a tecidos paravaginais e relativa dificuldade para produção de uma matriz estéril de poucos centímetros (2h de produção em fluxo laminar seguidas por 3h de cozimento em forno).

Objetivando superar as limitações dos estudos prévios realizados, estabelecer as bases para a produção de matrizes acelulares no Brasil de maneira reprodutível e melhorar as características dessas matrizes de fibras randômicas para aplicação em prolapso genital (particularmente no quesito de força tênsil máxima uma vez que o material já exibe uma boa biocompatibilidade), foi iniciada a pesquisa no campo de bioengenharia sintética em urologia em doutorado sanduíche na Universidade de Sheffield.

Conhecendo as variantes do método padrão para produção dessas matrizes por eletrofiação foi possível durante estágio na Universidade de Sheffield, através de variações nos parâmetros de rotação do coletor das fibras e realização do procedimento de co-eletrofiação (*i. e.* eletrofiação de duas soluções simultâneas no

mesmo coletor) a criação de uma matriz acelular de nano/microfibras eletrofiadas com características similares aos tecidos paravaginais humanos em termos de elasticidade, maleabilidade, espessura e biocompatibilidade sem incorrer na presença de nanoporos.

Partindo-se de polímeros sintéticos de ácido polilático levógeno (PLLA), foram eletrofiadas matrizes com características similares aos tecidos paravaginais tendo em mente a reprodutibilidade de maneira asséptica e necessidade de produção de neotecidos com a capacidade de carga e perfil de absorção melhores do que as atuais telas de Vicryl® tricotadas que já demonstraram falhas terapêuticas no passado (15).

Com o objetivo de aumentar a capacidade de customização de matrizes acelulares procurou-se um novo método para a produção de matrizes híbridas com fibras randômicas e alinhadas permitindo o aumento da tensão máxima uniaxial dessas matrizes sem a perda da capacidade de retenção de sutura observada nas matrizes completamente alinhadas (50).

Conseguindo-se atingir tal objetivo, haveria ainda a necessidade de esclarecer a porosidade, a biocompatibilidade, as propriedades mecânicas e o tempo de absorção das novas matrizes produzidas de PLLA híbrido frente as matrizes padrão de PLLA randômico (48).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1 – Estabelecer parâmetros de produção de matrizes híbridas e randômicas utilizando a técnica de eletrofiação e implantar a tecnologia em laboratório no Brasil permitindo seguimento dos experimentos.

2 – Avaliar se a produção de PLLA com maior força tênsil (matrizes híbridas) é factível e reprodutível usando a técnica de eletrofiação.

3 – Testar se as matrizes híbridas mantêm a biocompatibilidade já testada nas matrizes randômicas.

4 – Verificar se as matrizes híbridas têm força tênsil superior às matrizes randômicas nos testes eletromecânicos.

5 – Estudar a influência da cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (CTDA) sobre as propriedades mecânicas das matrizes estudadas.

6 – Avaliar a influência da hidrólise na perda de força tênsil das matrizes em experimentos de até 90 dias.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Desenvolvimento do novo método de produção de matrizes por eletrofição

A hipótese inicial aventada em Sheffield que o PLLA randômico recozido era o candidato ideal para aplicações em bioengenharia em urologia (particularmente como substituto de telas de polipropileno) foi testada comparando-se essa matriz com matrizes com parâmetros modificados durante sua produção objetivando melhora de resistência à tração. Matrizes de PLLA eletrofiado com fibras alinhadas e/ou parcialmente alinhadas foram verificadas se exibiam um melhor perfil de propriedades mecânicas mantendo ainda a afinidade celular.

O PLA puramente alinhado certamente exibiria um perfil de resistência tênsil maior, mas pela sua anisotropia não seria adequado para retenção dessa força tênsil através de suturas sendo então procurado um substituto do material puramente alinhado por formas híbridas.

Em experimentos realizados inicialmente no grupo de engenharia tecidual, Departamento de Ciências Materiais e Engenharia, Instituto de Pesquisa Kroto, Universidade de Sheffield, para a obtenção de matrizes de polímeros, polímeros comerciais de ácido poli-L-láctico (PLLA, Goodfellow, Huntingdon, UK) comprados na forma de grânulos de alto peso molecular foram dissolvidos em diclorometano 10% p/p (DCM, Sigma Aldrich, Dorset, UK), ejetados através de agulhas rombas de 20 G (20 G Blunt end tip-pink, Kidlington, Oxfordshire, UK) a uma taxa de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ (40 $\mu\text{L}/\text{min}$ por agulha para a configuração de múltiplas agulhas) e eletrofiados após estímulo de alta voltagem. Para produção de fibras randômicas foram utilizados voltagem de 17 Kv em fonte de alta tensão (Genvolt,

Bridgnorth, United Kingdom) e coletor aterrado cilíndrico coberto por papel alumínio autoclavado (80mm de diâmetro e 1600 mm de comprimento) em rotação de 300 rpm distante em 17 cm por 2 horas realizados dentro de cabine fluxo laminar (protocolo definido empiricamente baseado na percepção visual de que as fibras quando eletrofiadas por mais tempo não se depositavam no coletor aterrado). As mesmas ainda sofreram um recozimento em forno a 60°C por 3 horas com o objetivo de melhorar sua maneabilidade como já descrito e representado na Figura 3. Esse é considerado o protocolo clássico no laboratório da professora Sheila MacNeil para a produção de matrizes sintéticas de PLA, a chamada matriz de termo-PLAr ou tPLAr (48).

Figura 3. Diagrama representando configuração clássica para produção de matrizes randômicas de PLA

Para a produção de matrizes com a orientação da maioria de suas fibras alinhadas foram utilizadas as mesmas configurações de voltagem e distância com 1200rpm no cilindro coletor. Não utilizamos as fibras completamente alinhadas em todos os testes por conta das aplicações mais limitadas de seu uso (menor resistência a sutura, anisotropia excessiva, menor porosidade devido a presença de fibras mais compactas próximas umas das outras), exemplificando apenas alguns experimentos com parâmetros das fibras puramente alinhadas.

Foi então desenvolvido um novo método para produção de matrizes híbridas (combinação de matrizes alinhadas e randômicas por *co-spinning* – co-eletrofiação), utilizando-se o princípio de que fibras ejetadas próximas ao coletor tem menor espaço para espalhar-se e, portanto, tendem a coletar-se de maneira mais regular na superfície do coletor no sentido de seu eixo de rotação sendo potencialmente mais alinhadas.

Inicialmente as fibras ejetadas pelo método clássico de distribuição de 4 agulhas de cada lado do coletor tinham uma tendência a coletar-se no centro do mandril aterrado no lado mais próximo do mandril (o cone de Taylor não possuía espaço para distribuir as fibras ao longo de toda a superfície do coletor) e a solução encontrada para superar essa dificuldade foi a produção de um divisor especialmente desenhado para permitir a cobertura de toda a superfície do coletor com intervalos de 1cm entre cada uma de 12 saídas de igual diâmetro para agulhas.

Inicialmente manteve-se a configuração original para a matriz randômica com apenas 4 agulhas simultâneas e para divisão de fluxo do lado supostamente alinhado manteve-se 6 agulhas ativas na saída do divisor para cobrir toda a superfície do mandril sem desbalancear demais a proporção de alinhado e randômico (6 agulhas : 4 agulhas) uma vez que essa configuração foi a mínima para distribuir visualmente

fibras por toda a extensão do coletor. Foi optado por iniciar a eletrofiação da maneira habitual por 30 minutos e a partir daí co-eletrofiar polímeros alinhados com randômicos por 30 minutos para em seguida eletrofiar apenas fibras randômicas por mais 30 minutos (tempo determinado empiricamente baseado em proporcionalidade com o tempo de eletrofiação clássico de 2 h). Tal matriz foi chamada de híbrida 6:4 e visualmente teve um depósito mais acentuado de fibras mais alinhadas, apesar da tentativa de equilibrar a eletrofiação de cada uma mantendo a superfície porosa e não alinhada como a de uma matriz convencional puramente randômica.

Ao longo do projeto em Sheffield, com a disponibilidade de novos divisores, foi montado um esquema de co-eletrofiação com o uso de 24 agulhas simultâneas (12 agulhas : 12 agulhas). As configurações utilizadas para a produção de amostras de PLLA híbridas são ilustradas pelos esquemas de co-eletrofiação nas Figuras 4 e 5. Por conta da quantidade proporcionalmente produzida de cada componente eletrofiado ser maior, realizou-se uma camada de fibras randômicas por 15 min, seguida por 15 min de fibras alinhadas e randômicas e encerrando o processo com 15 minutos de depósito de fibras puramente aleatórias (12 agulhas : 12 agulhas). Dessa forma, foram obtidas matrizes mais ou menos alinhadas proporcionalmente chamadas 12:12 (Figura 5).

Os polímeros utilizados são aprovados pelas agências nacionais e internacionais de controle de drogas e medicamentos (ex. ANVISA e FDA) e são utilizados em pesquisa clínica por serem biodegradáveis e biocompatíveis (*i.e.* adequados para cultura de células e implante em mamíferos) (51).

Figura 4. Diagrama representando configuração 6:4 criada para produção de matrizes híbridas de PLA

Figura 5. Diagrama representando configuração 12:12 criada para produção de matrizes híbridas de PLA

3.2 Avaliação das Matrizes Produzidas com Fibras Randômicas e Híbridas

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As diferentes configurações de eletrofiação foram comparadas por meio de microscopia eletrônica de varredura realizada no Departamento de Ciências Biomédicas, Serviço de Microscopia Eletrônica, Universidade de Sheffield, com auxílio do Dr Chris J Hill, em aparelho Philips XL-20. Amostras foram aparadas e montadas sobre suportes metálicos de 12,5 mm, com íons de ouro depositados em espessura de aproximadamente 25 nm sobre as estruturas a serem analisadas por microscópio usando uma voltagem de aceleração de aproximadamente de 10-15Kv e um alvo de foco de entre 2 e 3 Å. Foram caracterizados os diâmetros das fibras, diâmetro dos poros entre as fibras (diâmetro de poro igual raiz quadrada de maior distância entre fibras vezes menor distância) obtidas medidas utilizando-se software ImageJ (National Institutes of Health, USA) em pelo menos 3 fotografias de microscopia eletrônica.

3.2.2 Medida de Densidade média das matrizes

A porosidade média das matrizes foi calculada pela razão entre a densidade observada em 9 pedaços de cada matriz produzidas dividida pela razão esperada do polímero maciço. Obtido das especificações do fabricante, a densidade do PLLA maciço é de 1,24 g/cm³.

3.2.3 Testes biomecânicos uniaxiais das matrizes

Testes biomecânicos de tensão uniaxiais foram realizados utilizando-se sistemas eletromecânicos (BOSE Electroforce 3100), no Departamento de Ciências

Materiais e Engenharia, Instituto de Pesquisa Kroto, Universidade de Sheffield, para obtenção de curvas tensão-deformação comparando-se as diferentes matrizes obtidas e testar a hipótese de que as matrizes híbridas aumentariam sua resistência a tração e diminuiriam sua elasticidade. Resumidamente, corpos de prova foram posicionadas entre as pinças do tensiômetro como já reportado em literatura (52). As curvas obtidas de tensão-deformação em ensaios uniaxiais com taxas de deformação de 0.1 mm/seg permitiram a obtenção de valores de resistência máxima, deformação na resistência máxima e módulo elástico (ou Módulo de Young) que foram comparados por análise de variância e teste de Tuley para análise de diferenças utilizando-se software GraphPad Prism versão 6.0. Para o cálculo desses valores a deformação foi normalizada pelo comprimento dos corpos de prova e a tensão foi normalizada pela área de secção transversa dos mesmos. O primeiro ponto de rotura (inflexão da curva de deformação) será considerado o ponto de resistência máxima (e a deformação na resistência máxima derivada desse valor no eixo X) enquanto que o módulo elástico (módulo de Young) será obtido através do cálculo da inclinação dos pontos lineares iniciais da curva de tensão-deformação em MPa (N/mm^2).

3.2.4 Testes de biocompatibilidade com implantação e cultivo de células nas matrizes

No Departamento de Ciências Materiais e Engenharia, Instituto de Pesquisa Kroto, Universidade de Sheffield, células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (CTDA) extraídas de doadores anônimos foram isoladas e caracterizadas como previamente descrito (53). Células em quarta passagem foram criopreservadas em 1 mL de 10% DMSO (dimetil sulfoxido) em soro fetal bovino.

Para os experimentos com matrizes, células foram ressuscitadas e mantidas a 37°C em DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina, 1% glutamina e 0,25% fungisona; foram utilizadas células em sexta passagem nos experimentos.

As matrizes sintéticas foram manipuladas em fluxo laminar utilizando-se técnica asséptica. Amostras de 1,5 cm por 1,5 cm foram colocadas em placas de 6 poços com um anel de metal de 1 cm de diâmetro para semeadura de 5×10^5 células em 0,5 mL de meio de cultura.

3.2.5 Teste de atividade metabólica das células implantadas

Após 2 h de incubação (37°C e 5% CO₂) para permitir adesão celular, as amostras foram lavadas com tampão fosfato e um ensaio de Alamar Blue® (Resazurina 5 µg/ml em PBS) incubado por 60 minutos. Absorbância a 570 nm foi medida em leitor colorimétrico para obter valores basais dos inícios dos experimentos. As amostras foram então lavadas com tampão fosfato e retornadas para condições normais de cultura para terem seus valores de absorbância nos ensaios de Alamar Blue® repetidos com 7 e 14 dias de cultura. Matrizes sem células foram também utilizadas como controles e as curvas de atividade metabólica obtidas para os materiais analisados.

3.2.6 Propriedades mecânicas das matrizes frente a teste de degradação das matrizes em meio de cultura em até 90 dias

Visando a simplificação para realização e interpretação dos experimentos, a eliminação da avaliação do fator remodelamento *in vitro* e aproveitando-se de que a degradação do PLLA dá-se por hidrólise não enzimática, optou-se por realizar teste de degradação/resistência a hidrólise expondo as matrizes híbridas e

randômicas a meio de cultura (DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina, 1% glutamina e 0,25% fungisona) em estufa a 37°C pelos períodos de 14, 30 e 90 dias com o objetivo de testar as propriedades mecânicas desses materiais nesses períodos, na tentativa de traçar um paralelo com uma possível degradação/enfraquecimento *in vivo* quando de um possível implante desses materiais. Dado que as matrizes não se misturavam facilmente com o meio de cultura por serem hidrofóbicas e não existirem células em cultura, foi utilizado álcool etílico como surfactante e o mesmo foi enxaguado no próprio meio de cultura antes de ser deixado em placa dentro de estufa.

3.2.7 Produção de matrizes sintéticas no Brasil

Adaptações foram realizadas no Brasil a medida que fornecedores locais eram diferentes e marcas utilizadas previamente nos experimentos no interior da Inglaterra não eram facilmente disponíveis aqui.

Para produção das matrizes foi utilizado o Laboratório da Divisão de Bioengenharia do InCor, gentilmente compartilhado pela Dra Idágene Cestari (diretora do Laboratório) contando com o auxílio da Enga. Helena Oyama (Enga. Chefe do Laboratório de Biomateriais). Foram mantidas as mesmas configurações originais para a criação das matrizes híbridas 12:12 com a diferença apenas no tamanho da mandril (40mm de diâmetro por 80mm de comprimento ao invés de 80mm por 1600mm) e tamanho dos divisores (6 agulhas espaçadas por 1cm ao invés de 12 agulhas espaçadas por 1cm) utilizados previamente. A adaptação foi necessária por conta de espaço disponível menor na capela para a manutenção perene da configuração para produção de matrizes.

Os polímeros, concentração, solventes, agulhas, taxas de ejeção, distâncias de trabalho e voltagem utilizados foram os mesmos do protocolo anterior, ácido poli-L-láctico (PLLA, Goodfellow, Huntingdon, UK) em grânulos, diclorometano 10% p/p (DCM, Sigma Aldrich, Dorset, UK), agulhas rombas de 20 G (20 G Blunt end tip-pink, Kidlington, Oxfordshire, UK), montados em bomba infusora (Nikkiso PSK-02, Houston, USA) ejetados em seringa de 20mL a uma taxa de 40 μ L/min por agulha e eletrofiados após estímulo com fonte de alta tensão (Faíscas, Porto Alegre, Brasil).

3.3 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e suas diferenças foram testadas contra hipótese nula de nenhuma diferença entre as amostras usando análise de variâncias (ANOVA) e testes de Tukey para diferenças utilizando-se software GraphPad Prism versão 6.0. A probabilidade de erro alfa utilizada para considerar as amostras diferentes foi de 5%, embora sejam exibidas em todos os gráficos as probabilidades obtidas nos testes mais importantes.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Produção de Matrizes PLLA alinhadas e híbridas

alinhadas/randômicas por eletrofiação

No desenvolvimento do método foi aumentado o número de agulhas capazes de realizar eletrofiação através de um divisor de fluxo condutivo. O tempo de produção de uma matriz randômica clássica previamente definido empiricamente de 2 h por folha de polímero para o PLLA randômico de 4 agulhas caiu para um tempo médio de produção ao redor de 45 minutos para o PLLA híbrido com 24 agulhas. Além do tempo, foram produzidas matrizes mais compactas e menos algodonosas que dispensam manipulação adicional de têmpera (que exigia outras 3 h) pois já atingem o coletor de maneira mais organizada e entrelaçada. A espessura média das matrizes e seu aspecto a manipulação são mostrados na tabela abaixo.

Tabela 3 - Tipos de matrizes produzidas e suas espessuras médias com EPM respectivo.

Tipo de Matriz	Espessura Média (μm) $\pm$ EPM	Aspecto
PLLA Randômico	260 + 1,47	Algodonoso
PLLA Randômico Recozido	97+0,62	Folha compacta
PLLA Híbrido 6:4	277,5 + 1,75	Folha compacta
PLLA Híbrido 12:12	155 + 1,04	Folha compacta
PLLA Alinhado	122,5+1,10	Folha compacta

4.2 Imagens de Microscopia de Varredura

Foram produzidos dois tipos de matrizes híbridas além de matrizes alinhadas e com fibras randômicas, variando-se a proporção do PLLA alinhado eletrofiado e PLLA randômico em função do número de agulhas utilizadas: na proporção 12:12 (total de 24 agulhas) e na proporção de 4:6 (dez agulhas), ilustradas por imagens de microscopia de varredura nas figuras 6 a 9.

Figura 6. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA randômicas

Figura 7. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbrido 6:4

Figura 8. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbrido 12:12

Figura 9. Imagem em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA alinhadas

4.3 Densidade das matrizes

Os resultados de medidas de densidade, como previstos pela presença de fibras mais compactas, variaram linearmente com a presença de maior quantidade de fibras alinhadas como ilustrado na figura 10.

Figura 10. Densidade de 5 tipos de matrizes de PLLA (média ± EPM, n=9). NS- não significante, *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

Tabela 4 - Estatística descritiva das densidades das fibras.

	PLAr	tPLA	12:12	6:4	PLAa
Média	11,11	13,94	16,13	20,20	80,65
Desvio Padrão	0,3333	0,8360	0,7511	1,422	6,675
EPM	0,1111	0,4180	0,3756	0,4740	3,337
IC 95% Inferior	10,85	12,61	14,93	19,11	70,03
IC 95% Superior	11,37	15,27	17,32	21,29	91,28

4.4 Propriedades mecânicas das matrizes randômicas e híbridas

Assim como a densidade aumentou com a progressão dos números de fibras alinhadas nas amostras, as propriedades mecânicas mostraram um aumento no módulo de elasticidade (indicando matrizes tanto mais rígidas quanto mais alinhadas).

O aumento na resistência máxima com matrizes híbridas 12:12 foi de aproximadamente 3 vezes (1,173 MPa $\pm$ 0,105 vs. 3,626 MPa $\pm$ 0,166, $p < 0,0001$) enquanto das matrizes 6:4 foi de aproximadamente 4 vezes (1,173 MPa $\pm$ 0,105 vs. 4,833 MPa $\pm$ 0,122, $p < 0,0001$) em relação as matrizes randômicas recozidas, enquanto que a deformação na resistência máxima das matrizes híbridas diminuiu (mostrando que as amostras mais alinhadas tendem a se romper com deformações menores) com valores de deformação máxima para o PLA recozido de 67,1%, PLA híbrido 12:12 de 35% e PLA híbrido 6:4 de 21,7% como mostrado na figura 11.

Figura 11. Propriedades biomecânicas de 5 tipos de configurações de PLLA (média±EPM, n=9). As linhas pontilhadas mostram as propriedades de tecidos paravaginais nativos para comparação.

*p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

Tabela 5 - Estatística descritiva dos valores de Deformação na Tensão**Máxima pré cultura de células.**

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4	PLA alinhado
Média	0,920	0,671	0,351	0,217	0,192
Desvio Padrão	0,070	0,158	0,0695	0,131	0,0321
EPM	0,023	0,065	0,0284	0,044	0,018
IC 95% Inferior	0,865	0,505	0,278	0,116	0,112
IC 95% Superior	0,974	0,837	0,424	0,318	0,271

Tabela 6 - Estatística descritiva dos valores de Módulo de Young pré cultura de células.

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4	PLA alinhado
Média	9,444	33,25	128,3	179,4	447,4
Desvio Padrão	5,175	14,75	10,27	39,33	40,19
EPM	1,725	6,020	4,193	13,11	23,21
IC 95% Inferior	5,467	17,77	117,5	149,2	347,6
IC 95% Superior	13,42	48,72	139,0	209,7	547,3

Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores de Tensão Máxima pré cultura de células.

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4	PLA alinhado
Média	0,450	1,173	3,626	4,833	22,06
Desvio Padrão	0,0791	0,257	0,407	0,367	2,550
EPM	0,0263	0,105	0,166	0,122	1,472
IC 95% Inferior	0,389	0,904	3,199	4,551	15,72
IC 95% Superior	0,511	1,443	4,053	5,116	28,39

Testes uniaxiais foram novamente realizados comparando amostras de PLLA com e sem a presença de células após 14 dias em cultura. Os resultados dessa vez mostraram que amostras randômicas, por partirem de um valor menor basal, têm um incremento de suas propriedades de rigidez e resistência enquanto que amostras alinhadas têm uma queda em suas propriedades após a adição de células, a despeito do reforço exercido pela produção de matriz extracelular nesse período. A figura 12 mostra os resultados dos testes biomecânicos após 14 dias de cultura com CTDA para matrizes de PLLA híbrido alinhado (12:12) e PLLA randômico.

Os valores de tensão máxima nas matrizes com células mostraram incremento de quase 6 vezes para as matrizes de termo PLA versus matrizes híbridas 12:12 (0,762 MPa $\pm$ 0,132 vs. 4,517 MPa $\pm$ 0,409, $p < 0,0005$) e de quase 5 vezes para matrizes híbridas 6:4 (0,762 MPa $\pm$ 0,132 vs. 3,733 MPa $\pm$ 1,027, $p < 0,0005$). Os

valores de deformação na tensão máxima mantiveram-se iguais entre todas as matrizes testadas, com deformações na tensão máxima ao redor de 35%.

Figura 12. Propriedades biomecânicas de PLLA randômico e PLLA híbrido (12:12) (média±EPM, n=9). As linhas pontilhadas mostram as propriedades de tecidos paravaginais nativos para comparação (45).

*p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

Tabela 8 - Estatística descritiva dos valores de Deformação na Tensão**Máxima pós cultura de células.**

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4
Média	0,359	0,3439	0,339	0,374
Desvio Padrão	0,0496	0,0489	0,010	0,190
EPM	0,0286	0,0282	0,005	0,134
IC 95% Inferior	0,236	0,222	0,316	-1,333
IC 95% Superior	0,483	0,465	0,362	2,082

Tabela 9 - Estatística descritiva dos valores de Módulo de Young pós cultura de células.

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4
Média	2,014	6,275	141,5	119,6
Desvio Padrão	1,027	3,311	29,70	39,35
EPM	0,593	1,912	17,15	27,83
IC 95% Inferior	-0,536	-1,950	67,74	-233,9
IC 95% Superior	4,565	14,50	215,3	473,2

Tabela 10 - Estatística descritiva dos valores de Tensão Máxima pós cultura de células.

	PLAr	Termo PLA	PLA híbrido 12:12	PLA híbrido 6:4
Média	0,423	0,762	4,517	3,733
Desvio Padrão	0,203	0,228	0,708	1,452
EPM	0,117	0,132	0,409	1,027
IC 95% Inferior	-0,080	0,194	2,759	-9,316
IC 95% Superior	0,927	1,330	6,276	16,78

4.5 Atividade metabólica nas matrizes randômicas e híbridas

A atividade metabólica de células-tronco mesenquimais derivadas de adipócitos (CTDA) aferida pelo Alamar Blue® mostrou aumento de absorbância equivalente para o PLLA randômico em relação a matriz híbrida 6:4 até o período estudado de 14 dias em cultura. Os resultados para os testes de absorbância são mostrados na Figura 13.

Figura 13. Atividade metabólica dosada por Alamar Blue® em 7 e 14 dias de cultura para matrizes de PLLA randômicas e híbridas (média±EPM, n=9).

*p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

Tabela 11 - Estatística descritiva dos valores de atividade metabólica dosada por Alamar Blue®.

Dias	tPLAr			PLA 6:4		
	Média	Desvio Padrão	SEM	Média	Desvio Padrão	SEM
0	0,00842	0,01272	0,00424	0,00717	0,00362	0,00148
7	0,01658	0,00722	0,00241	0,01883	0,00818	0,00334
14	0,02579	0,00766	0,00255	0,02267	0,01192	0,00397

4.6 Propriedades mecânicas das matrizes randômicas e híbridas após 90 dias de exposição a meio de cultura

Testes biomecânicos uniaxiais realizados com amostras aos 0, 14, 30 e 90 dias mostraram uma diminuição das propriedades mecânicas das amostras ao longo do tempo a despeito do curto tempo de análise e tempo de degradação estimado *in vivo* para PLLA ao redor de 1 ano. Para o termo PLA sem álcool como surfactante a queda na tensão máxima foi da ordem de 3 vezes em 90 dias ($1,878 \text{ MPa} \pm 0,091$ vs. $0,622 \text{ MPa} \pm 0,052$, $p < 0,0001$) enquanto que para o PLA 6:4 sem álcool foi de cerca de 1,5 vezes ($9,222 \text{ MPa} \pm 0,683$ vs. $5,844 \text{ MPa} \pm 0,501$, $p < 0,0001$).

A utilização de álcool como surfactante nas amostras mostrou efeito significativo apenas para os valores de tensão máxima das amostras de PLA 6:4 com quedas de 6,4% no dia 0 ($p < 0,05$), 71% ($p < 0,0001$) no dia 14, 40% no dia 30 ($p < 0,0001$) e 12% no dia 90 ($p < 0,005$), não tendo impacto nas amostras de termo PLA.

Figura 14. Propriedades mecânicas do PLLA randômico e PLLA híbrido tratadas ou não com álcool, nos dias 0, 14, 30 e 90 mantidos em ambiente estéril em meio de cultura. Resultado expressados em média±EPM, n=9. As linhas pontilhadas mostram as propriedades de tecidos paravaginais nativos para comparação (45).

*p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005, ****p<0,0001

Tabela 12 - Estatística descritiva dos valores de propriedades biomecânicas do PLLA randômico e híbrido em até 90 dias em meio de cultura.

A: Deformação na tensão máxima, B: Módulo de Young, C: Tensão máxima

A		tPLAr		tPLAr OH			PLA 6:4			PLA 6:4 OH		
Dias	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
0	0,552	0,067	9	0,569	0,077	9	0,306	0,006	9	0,308	0,006	9
14	0,381	0,076	9	0,113	0,038	9	0,106	0,006	9	0,038	0,002	9
30	0,356	0,129	9	0,059	0,006	9	0,118	0,031	9	0,052	0,001	9
90	0,089	0,007	9	0,061	0,006	9	0,070	0,003	9	0,056	0,003	9
B		tPLAr		tPLAr OH			PLA 6:4			PLA 6:4 OH		
Dias	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
0	46,000	2,041	9	38,222	4,294	9	223,333	11,304	9	204,444	13,371	9
14	31,333	5,573	9	38,667	4,167	9	213,111	6,398	9	196,667	16,833	9
30	33,000	6,005	9	39,889	4,653	9	179,444	20,420	9	164,444	8,012	9
90	18,111	0,351	9	17,889	0,423	9	169,333	6,896	9	179,667	12,531	9
C		tPLAr		tPLAr OH			PLA 6:4			PLA 6:4 OH		
Dias	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
0	1,878	0,091	9	1,822	0,118	9	9,222	0,683	9	8,667	0,471	9
14	1,044	0,044	9	1,033	0,033	9	7,111	0,423	9	4,156	0,169	9
30	1,156	0,044	9	0,978	0,022	9	6,289	0,458	9	4,478	0,151	9
90	0,622	0,052	9	0,511	0,035	9	5,844	0,501	9	5,189	0,102	9

4.7 Matrizes produzidas no Brasil

Matrizes randômicas e híbridas foram produzidas no Brasil e avaliadas por microscopia eletrônica (Hitachi TM 3000, Japan) em voltagem de aceleração de 5Kv. As matrizes produzidas aqui exibiram arquitetura equivalente e distribuição das fibras compatíveis com a das matrizes randômicas e híbridas produzidas no Reino Unido.

Figura 15. Imagens em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA híbridas brasileiras equivalentes a matrizes híbridas 12:12.

Figura 16. Imagens em microscopia de varredura mostrando matriz de fibras de PLLA randômicas brasileiras equivalentes a matrizes randômicas inglesas de PLA.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Com o trabalho iniciado em Sheffield, Reino Unido, no próprio laboratório em que se desenvolveu a ideia do *background* prévio de que o PLLA eletrofiado seria o substituto ideal para as atuais telas de polipropileno, foi realizada essa série de modificações nas configurações de eletrofiação com o objetivo de melhorar a qualidade das matrizes em termos de propriedades mecânicas.

Independentemente do material absorvível utilizado, após seu período de degradação o mesmo fica mais fraco e sob risco de fratura, e o PLLA temperado já estudado quando eletrofiado de maneira randômica produz amostras com força tênsil muito próxima a dos tecidos nativos (48). Na tentativa de aumentar a força tênsil das matrizes de PLLA, o caminho inicialmente escolhido foi a produção de matrizes alinhadas do mesmo, mas como matrizes com as fibras todas na mesma direção não mostrariam resistência a sutura (necessária para a aposição dos tecidos junto as matrizes) foi criado e desenvolvido um método para produção de matrizes híbridas com a disposição de fibras alinhadas intercaladas com as randômicas com o objetivo de impor resistência a sutura ao mesmo tempo em que aumentasse a resistência a tensão.

Analisando os dados apresentados em conjunto, temos que as matrizes produzidas a partir de PLLA alinhado em algum grau são muito mais fortes e rígidas do que as matrizes randômicas (padrão) e até mesmo que os valores tidos como padrão para os tecidos paravaginais (45), apresentando um declínio aceitável das propriedades do PLLA híbrido em relativo curto período (90 dias) de exposição a meio de cultura e mantendo suas propriedades de biocompatibilidade e relativa facilidade/reprodutibilidade na produção. Adicionar células com o intuito de se

melhorar as propriedades mecânicas das matrizes híbridas, que partem de valores mais altos de resistência a tensão e módulo elástico, não exerceu influência favorável sobre as mesmas. A mesma adição para matrizes randômicas causou efeito positivo sobre as propriedades mecânicas, ainda sim sem fazê-las ultrapassar os valores tidos como normais (Figura 12).

Tendo por base a biocompatibilidade comparável das matrizes independentemente da orientação das fibras produzidas e de sua porosidade, foi possível a criação de uma potencial matriz comercializável estéril que não demandaria manipulação em laboratório com cultivo de células, visto que a mesma mantém propriedades desejáveis independente de seu cultivo, o que facilitaria dramaticamente sua implantação além de reduzir custos.

A maneira encontrada de reforçar as matrizes aumentando sua anisotropia as tornou mais suscetíveis aos efeitos da hidrólise sobre as fibras e favoreceu seu enfraquecimento mais rápido. Lesões em um ponto na fibra de polímero alinhado por eletrofiação comprometem toda a resistência a tensão no comprimento da macroestrutura e esse efeito teoricamente seria ainda mais evidente quanto menos reforços horizontais cruzados houvessem – caso de matrizes mais alinhadas – (Figura 17 a seguir), impondo ainda mais restrições à utilização de matrizes puramente alinhadas e favorecendo ainda mais conformações híbridas tornando-as atraentes do ponto de vista clínico para correções de defeitos de parede como hérnias e prolapso genital.

Figura 17. Mecanismo proposto para explicar queda de propriedades mecânicas após 14, 30 e 90 dias em meio de cultura. Fibras com poucas interligações tendem a oferecer menor resistência ao conjunto da estrutura quando danificadas pela hidrólise em pequenos pontos

Como possível crítica ao polímero estudado (PLLA), pode-se afirmar que o mesmo apresentou degradação de maneira muito acentuada mesmo *in vitro*, tornando o PLA randômico (isotrópico) com propriedades de tensão máxima similares aos os tecidos nativos com cerca de 90 dias apenas. Esse período não é necessariamente suficiente para repopulação e restauro de propriedades originais do tecido a ser substituído, o que carrega um risco de uma possível falha terapêutica precoce numa situação de implantação sem células (degradação exemplificada na Figura 1), fato já ocorrido no passado com as telas de Vicryl® (15). Outra observação importante foi que, embora seja possível a produção de matrizes mais fortes com a modificação de sua microestrutura, as matrizes mais resistentes a tração mostram-se menos elásticas, propriedade que deve ser levada em conta

quando se planeja a substituição de tecidos nativos com distensibilidade importante. Por essa razão, impõe-se o estudo de outros materiais com perfil de absorção mais longo e naturalmente mais fortes e resistentes a hidrólise como policaprolactona e poliuretanos.

O presente estudo em conjunto com outros demonstra a importância de uma base sólida de conhecimento do planejamento à execução das etapas da construção de um material sintético para que sejam cumpridas etapas de segurança e eficácia em toda translação da bancada à beira do leito, etapas já ignoradas no passado.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

1 – Foi estabelecido método de produção de matrizes randômicas e alinhadas utilizando a técnica de eletrofiação e tal tecnologia foi incorporada ao arsenal de pesquisa do departamento de Urologia da FMUSP.

2 – A produção de PLLA com maior força tênsil (matrizes híbridas) é factível e reprodutível usando a técnica de eletrofiação.

3 – As matrizes híbridas produzidas mostraram a mesma biocompatibilidade das matrizes randômicas e adicionalmente, as células em ambas as matrizes mostraram a mesma atividade metabólica.

4 – As matrizes híbridas mostraram ser significativamente superiores as matrizes randômicas nos testes eletromecânicos em termos de resistência a tração.

5 – A incorporação de células às matrizes híbridas não modificou sua resistência tênsil no período estudado de 14 dias.

6 – Houve perda de força tênsil nos experimentos de 90 dias com exposição a meio de cultura a 37°C, porém com as matrizes híbridas mantendo-se mais resistentes que os tecidos hígidos e as matrizes randômicas, atingindo significância estatística.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de quedas de propriedades mecânicas em médio prazo (90 dias) observadas e a indagação de plausibilidade na utilização do PLLA para correção de defeitos *in vivo*, houve o desenvolvimento e incorporação de técnica original de eletrofiação mais eficiente na produção de matrizes, que permitirá o prosseguimento de novas investigações no futuro. O PLA, apesar da alta biocompatibilidade, mostrou que para substituir as telas de polipropileno com menor risco de falha terapêutica em termos anatômicos, deverá ser combinado ou substituído por materiais de maior longevidade e resistência a hidrólise.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Swift S, Woodman P, O'Boyle A, Kahn M, Valley M, Bland D, et al. Pelvic Organ Support Study (POSST): The distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2005 Mar;192(3):795–806.
2. Wu JM, Matthews CA, Conover MM, Pate V, Jonsson Funk M. Lifetime risk of stress urinary incontinence or pelvic organ prolapse surgery. *Obstet Gynecol*. 2014 Jun;123(6):1201–6.
3. Fialkow MF, Newton KM, Lentz GM, Weiss NS. Lifetime risk of surgical management for pelvic organ prolapse or urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2008 Mar;19(3):437–40.
4. Olsen AL, Smith VJ, Bergstrom JO, Colling JC, Clark AL. Epidemiology of surgically managed pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Obstet Gynecol*. 1997 Apr;89(4):501–6.
5. Weber AM, Abrams P, Brubaker L, Cundiff G, Davis G, Dmochowski RR, et al. The standardization of terminology for researchers in female pelvic floor disorders. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2001;12(3):178–86.
6. Clark AL, Gregory T, Smith VJ, Edwards R. Epidemiologic evaluation of reoperation for surgically treated pelvic organ prolapse and urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Nov;189(5):1261–7.
7. Ulmsten U, Henriksson L, Johnson P, Varhos G. An ambulatory surgical procedure under local anesthesia for treatment of female urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 1996;7(2):81-85; discussion 85-86.
8. Dällenbach P. To mesh or not to mesh: a review of pelvic organ

reconstructive surgery. *Int J Womens Health*. 2015;7:331–43.

9. Gigliobianco G, Regueros SR, Osman NI, Bissoli J, Bullock AJ, Chapple CR, et al. Biomaterials for pelvic floor reconstructive surgery: how can we do better? *BioMed Res Int*. 2015;2015:968087.

10. Committee on Gynecologic Practice. Committee Opinion no. 513: vaginal placement of synthetic mesh for pelvic organ prolapse. *Obstet Gynecol*. 2011 Dec;118(6):1459–64.

11. Ward KL, Hilton P, UK and Ireland TVT Trial Group. A prospective multicenter randomized trial of tension-free vaginal tape and colposuspension for primary urodynamic stress incontinence: two-year follow-up. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Feb;190(2):324–31.

12. Mahon J, Varley D, Glanville J. Summaries of the safety/adverse effects of vaginal tapes/slings/meshes for stress urinary incontinence and prolapse. *Med Healthc Prod Regul Agency*. 2012;

13. Schultz DG. FDA Public Health Notification: serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh in repair of pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. *Food Drug Adm Silver Spring Md USA*. 2008;

14. Administration UF and D, Administration UF and D. FDA safety communication: update on serious complications associated with transvaginal placement of surgical mesh for pelvic organ prolapse. July. 2011;13:2011.

15. Weber AM, Walters MD, Piedmonte MR, Ballard LA. Anterior colporrhaphy: a randomized trial of three surgical techniques. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Dec;185(6):1299-1304; discussion 1304-1306.

16. FitzGerald MP, Mollenhauer J, Bitterman P, Brubaker L. Functional

failure of fascia lata allografts. *Am J Obstet Gynecol*. 181(6):1339–46.

17. Owens DC, Winters JC. Pubovaginal sling using Duraderm™ graft: Intermediate follow-up and patient satisfaction. *Neurourol Urodyn*. 2004;23(2):115–8.
18. John TT, Aggarwal N, Singla AK, Santucci RA. Intense inflammatory reaction with porcine small intestine submucosa pubovaginal sling or tape for stress urinary incontinence. *Urology*. 2008 Nov;72(5):1036–9.
19. Ho K-LV, Witte MN, Bird ET. 8-ply small intestinal submucosa tension-free sling: spectrum of postoperative inflammation. *J Urol*. 2004 Jan;171(1):268–71.
20. Maher C, Feiner B, Baessler K, Christmann-Schmid C, Haya N, Marjoribanks J. Transvaginal mesh or grafts compared with native tissue repair for vaginal prolapse. *Transvaginal Mesh Grafts Comp Native Tissue Repair Vaginal Prolapse* [Internet]. 2016;2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD012079>
21. Falcão SC, Coelho AR de B, Evêncio Neto J. Biomechanical evaluation of microbial cellulose (*Zoogloea* sp.) and expanded polytetrafluoroethylene membranes as implants in repair of produced abdominal wall defects in rats. *Acta Cirúrgica Bras Soc Bras Para Desenvolvid Pesqui Em Cir*. 2008 Apr;23(2):184–91.
22. Gonçalves de Lucena R. Utilização do biopolímero de cana-de-açúcar como novo material para sling pubo vaginal: análise estereológica. 2007;
23. Carvalho Junior AM de, Santos MM, Barkokébas BB, Andrade Aguiar JL de, Lima SVC, Dambros M. Characterization of the deposition of collagen fibers and lithogenic potential in bladder of rats submitted to a sugar cane biopolymer graft. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol*. 2012 Aug;38(4):544–51.

24. Lima SVC, de Oliveira Rangel AE, de Melo Lira MM, Pinto FCM, Campos Júnior O, Sampaio FJB, et al. The Biocompatibility of a Cellulose Exopolysaccharide Implant in the Rabbit Bladder When Compared With Dextranomer Microspheres Plus Hyaluronic Acid. *Urology*. 2015 Jun;85(6):1520.e1-6.
25. Amid PK. Classification of biomaterials and their related complications in abdominal wall hernia surgery. *Hernia*. 1997;1(1):15–21.
26. Cervigni M, Natale F. The use of synthetics in the treatment of pelvic organ prolapse. *Curr Opin Urol*. 2001 Jul;11(4):429–35.
27. Winters JC, Fitzgerald MP, Barber MD. The use of synthetic mesh in female pelvic reconstructive surgery. *BJU Int*. 2006 Sep;98 Suppl 1:70–76; discussion 77.
28. Birch C, Fynes MM. The role of synthetic and biological prostheses in reconstructive pelvic floor surgery. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2002 Oct;14(5):527–35.
29. Slack M, Sandhu JS, Staskin DR, Grant RC. In vivo comparison of suburethral sling materials. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2006 Feb;17(2):106–10.
30. Julian TM. The efficacy of Marlex mesh in the repair of severe, recurrent vaginal prolapse of the anterior midvaginal wall. *Am J Obstet Gynecol*. 1996 Dec;175(6):1472–5.
31. Debodinance P, Cosson M, Burlet G. Tolerance of synthetic tissues in touch with vaginal scars: review to the point of 287 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999 Nov;87(1):23–30.
32. Hong Y, Legge RL, Zhang S, Chen P. Effect of amino acid sequence and

pH on nanofiber formation of self-assembling peptides EAK16-II and EAK16-IV.

Biomacromolecules. 2003 Oct;4(5):1433–42.

33. Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. Tissue Eng. 2006 Mar;12(3):435–47.

34. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. Biotechnol Adv. 2010 Jun;28(3):325–47.

35. Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. Sel Pap Spec Tech Sess Electrostat Polym Process Charge Monit 1993 IEEE Ind Appl Soc Meet. 1995 Aug;35(2–3):151–60.

36. Pham QP, Sharma U, Mikos AG. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. Tissue Eng. 2006 May;12(5):1197–211.

37. Ramakrishna S. An introduction to electrospinning and nanofibers [Internet]. World Scientific; 2005. (An introduction to electrospinning and nanofibers). Available from:
http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=1MBgDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&ots=U0kN762yxa&sig=yNuwOIEf2T_hq68233QiFnA-DMM

38. Hunter GL, Weeks ER. The physics of the colloidal glass transition. Rep Prog Phys Phys Soc G B. 2012 Jun;75(6):066501.

39. Murugan R, Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. Tissue Eng. 2006 Mar;12(3):435–47.

40. Sacks MS, Sun W. Multiaxial mechanical behavior of biological materials. Annu Rev Biomed Eng. 2003;5:251–84.

41. Choe JM, Kothandapani R, James L, Bowling D. Autologous, cadaveric, and synthetic materials used in sling surgery: comparative biomechanical analysis. *Urology*. 2001 Sep;58(3):482–6.
42. Mangera A, Bullock AJ, Chapple CR, Macneil S. Are biomechanical properties predictive of the success of prostheses used in stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse? A systematic review. *Neurourol Urodyn*. 2012 Jan;31(1):13–21.
43. Osman N, Roman S, Bissoli J, Sefat F, MacNeil S, Chapple C. Designing a novel tissue inductive bio-absorbable implant for pelvic floor repair: An assessment of tensile and surgical handling properties versus polypropylene mesh and porcine small intestine submucosa. *Neurourol Urodyn*. 2013;32(6):507–932.
44. Karram MM, Bhatia NN. Patch procedure: modified transvaginal fascia lata sling for recurrent or severe stress urinary incontinence. *Obstet Gynecol*. 1990 Mar;75(3 Pt 1):461–3.
45. Lei L, Song Y, Chen R. Biomechanical properties of prolapsed vaginal tissue in pre- and postmenopausal women. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*. 2007 Jun;18(6):603–7.
46. Ashton-Miller JA, DeLancey JOL. On the Biomechanics of Vaginal Birth and Common Sequelae. *Annu Rev Biomed Eng*. 2009;11(1):163–76.
47. Junge K, Klinge U, Prescher A, Giboni P, Niewiera M, Schumpelick V. Elasticity of the anterior abdominal wall and impact for reparation of incisional hernias using mesh implants. *Hernia*. 2001;5(3):113–8.
48. Mangera A, Bullock AJ, Roman S, Chapple CR, MacNeil S. Comparison of candidate scaffolds for tissue engineering for stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse repair. *BJU Int*. 2013 Sep;112(5):674–85.

49. Blackwood KA, McKean R, Canton I, Freeman CO, Franklin KL, Cole D, et al. Development of biodegradable electrospun scaffolds for dermal replacement. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(21):3091–104.
50. Roman S, Mangir N, Bissoli J, Chapple CR, MacNeil S. Biodegradable scaffolds designed to mimic fascia-like properties for the treatment of pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence. *Biodegrad Scaffolds Des Mimic Fascia- Prop Treat Pelvic Organ Prolapse Stress Urin Incontinence*. 2016;30(10):1578–88.
51. Bye FJ, Wang L, Bullock AJ, Blackwood KA, Ryan AJ, MacNeil S. Postproduction processing of electrospun fibres for tissue engineering. *J Vis Exp JoVE*. 2012;(66).
52. Selim M, Bullock AJ, Blackwood KA, Chapple CR, MacNeil S. Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra. *BJU Int*. 2011 Jan;107(2):296–302.
53. Roman S, Mangera A, Osman NI, Bullock AJ, Chapple CR, MacNeil S. Developing a tissue engineered repair material for treatment of stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse-which cell source? *Neurourol Urodyn*. 2014 Jun;33(5):531–7.