

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

Marina Moraes Mattarredona Brião

**DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO A PARTIR DA  
ASSOCIAÇÃO DE BIOMATERIAIS COM CÉLULAS-TRONCO**

Porto Alegre

Janeiro, 2020

Marina Moraes Mattarredona Brião

**DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO A PARTIR DA  
ASSOCIAÇÃO DE BIOMATERIAIS COM CÉLULAS-TRONCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pranke

Coorientadora: Dra. Natasha Maurmann

Porto Alegre

Janeiro, 2020

## **Apresentação**

A presente dissertação foi desenvolvida no laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia e no laboratório de Células-tronco do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e o Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT) foram os órgãos fomentadores do trabalho. Foram realizadas parcerias com o Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI) de Campinas – SP e com o Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, para a obtenção, respectivamente, dos produtos de impressão 3D e da biocerâmica utilizadas no trabalho.

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a meus pais e familiares pela confiança nas minhas capacidades e por proverem tudo que eu precisei para chegar até aqui. Agradeço à professora Patricia Pranke pela oportunidade de desenvolver o trabalho de mestrado no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Universidade Federal do Rio Grande do Sul junto ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Agradeço a todos os amigos que estiveram sempre ao meu lado, aos que conheci antes do mestrado, e aos que tive a sorte de conhecer durante essa jornada. Amanda, Eduardo, Isadora, Marjoriane e Leonardo, meus colegas de sala de aula e amigos para compartilhar as dificuldades que o mestrado traz e os momentos felizes de quando conseguimos nossos objetivos.

Aos colegas de laboratório, pelo convívio, o apoio, a amizade e a tentativa de melhorar quando as coisas não iam bem. Após esses dois anos de mudanças e evoluções, é impossível não agradecer a duas pessoas em especial.

Primeiramente, à minha coorientadora, Natasha Maurmann. Agradeço por teus ensinamentos, tua dedicação e paciência - desde a idealização do projeto de mestrado, ao planejamento dos experimentos, e a execução mais otimizada possível de todas as coisas que foram necessárias para essa dissertação existir. Além disso, devo também agradecer pela minha “adoção” quando cheguei em Porto Alegre e pela maneira como fui sendo guiada e ensinada com calma até que pudesse “pipetar com as minhas próprias mãos”.

E, é claro, à minha querida aluna de iniciação científica, Luiza Oliveira, que me acompanhou na maioria do mestrado, sem quem hoje certamente essa dissertação não existiria. Obrigada pela dedicação, pelo apoio e por segurar as pontas quando eu achei que não tinha mais força para continuar o estudo.

Mesmo que passasse outros dois anos em curso, acho que não seria capaz de encontrar palavras que expressassem minha gratidão à Rafaela Nobre, que esteve ao meu lado diariamente me apoiando e me acalmando mesmo durante as

maiores das tempestades. Obrigada por sempre me tranquilizar e ajudar a procurar o que há de melhor em mim.

Finalmente, à banca que avalia esta dissertação, pelo tempo e dedicação e a todos os professores, pela tentativa de passar adiante os conhecimentos que acumularam ao longo dos anos e por manterem a universidade como uma ferramenta de multiplicação de conhecimento.

Não devemos ter medo das novas ideias! Elas podem significar a diferença entre o triunfo e o fracasso.

Napoleon Hill

## RESUMO

**Introdução:** A perda óssea, seja por fraturas, remoção por conta de tumores ou doenças como a osteoporose, representa uma grande preocupação no que se refere a saúde humana. Nesse contexto, a engenharia de tecidos na medicina regenerativa, pode ser utilizada visando a produção de substitutos para o tecido lesado ou removido. Diversas técnicas têm sido utilizadas na produção de biomateriais, ou *scaffolds*, que mimetizam a matriz extracelular nativa para cultivo de células. As células-tronco mesenquimais são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares tais como os osteoblastos, além de possuírem alta capacidade de replicação. **Objetivos:** Desenvolver *scaffolds* para uso em associação com células-tronco mesenquimais provenientes de dentes decíduos esfoliados humanos, visando posterior aplicação na medicina regenerativa relacionada ao tecido ósseo. **Métodos:** As células-tronco mesenquimais foram isoladas de dentes decíduos esfoliados e caracterizadas. A viabilidade dessas células foi testada quando cultivadas em vários biomateriais, como o hidrogel de alginato em diversas concentrações e solventes, como produzido por deposição manual e bioimpressão. Além disso, as células foram cultivadas em estruturas de policaprolactona em duas diferentes formas, impressos tridimensionais e fibras obtidas por eletrofiação, bem como foram expostas a biocerâmicas durante o cultivo. Ensaio de *Live/Dead* com calceína e iodeto de propídeo foi realizado para avaliação qualitativa da viabilidade. Por fim, os *scaffolds* foram testados em conjunto em uma avaliação *in vitro* e em um teste piloto *in vivo*. **Resultados:** Vista a utilidade da presença da biocerâmica na diferenciação osteogênica, a concentração desse biomaterial utilizado no trabalho foi a de 1 mg/mL, uma vez que foi possível manter a viabilidade celular. Para a formação do hidrogel foi escolhida uma concentração de 3% de alginato, utilizando a água como solvente. A bioimpressão incrementou a viabilidade aos 20 dias de cultivo. A utilização de todos os biomateriais em associação permitiu a formação de um *scaffold* rígido com células viáveis e que se diferenciaram na linhagem osteogênica. Com os resultados qualitativos do teste piloto *in vivo* foi possível observar que o defeito gerado não foi totalmente regenerado espontaneamente. Já a adição dos biomateriais mostrou neotecido integrado aos biomateriais e a avaliação histológica, demonstrou capacidade de produção de matriz mineralizada. **Conclusão:** Foi possível a construção de um *scaffold* a partir da associação de diversos biomateriais, originando um ambiente tridimensional no qual as células puderam colonizar, proliferar e se diferenciar na linhagem osteogênica. O teste *in vivo* indicou a possibilidade de utilizar esse *scaffold* para a substituição do tecido ósseo. Sendo assim, o biomaterial produzido representa um sistema promissor para o cultivo de células-tronco mesenquimais, visando a mimetização do tecido ósseo nativo que pode ser utilizado para a restauração quando aplicado na medicina regenerativa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bone loss, whether due to fractures, removal as a result of tumors or to diseases such as osteoporosis, is a major concern for human health. In this context, tissue engineering combined with regenerative medicine can be used to produce substitutes for damaged or removed tissue. Several techniques have been applied in the production of scaffolds that mimic the native extracellular matrix for cell culture. Mesenchymal stem cells are able to differentiate into several cell types, among them osteoblasts, besides having a high capacity for replication. **Objectives:** To develop scaffolds for use in association with mesenchymal stem cells from human exfoliated deciduous teeth for later application in regenerative medicine related to bone tissue. **Methods:** Mesenchymal stem cells were isolated from exfoliated deciduous teeth and characterized. The viability of these cells was tested when cultivated in various biomaterials, such as alginate hydrogel in various concentrations and solvents, which were produced by manual deposition and bioprinting. In addition, the cells were cultivated in polycaprolactone structures in two different forms, three-dimensional prints and electrospun fibers, as well as exposed to bioceramics during cultivation. A Live/Dead assay with calcein and propidium iodide was performed for qualitative viability measurement. Finally, the scaffolds were tested together in an *in vitro* evaluation and *in vivo* pilot test. **Results:** The bioceramic concentration chosen for the study was 1mg / mL, although it did not promote an increase in cell viability. The ideal alginate concentration for hydrogel formation was chosen as 3% using water as a solvent. Bioprinting increased cell viability at 20 days of cultivation. The use of all biomaterials in combination allowed for the formation of a rigid scaffold with viable cells that differentiated in the osteogenic lineage. With the qualitative results from the *in vivo* pilot test it was possible to observe that the generated defect was not completely spontaneously regenerated. The addition of biomaterials, however, seems to have caused a formation of a neotissue near the biomaterials and the histological analysis showed potential in mineralizing matrix production. **Conclusion:** It was possible to build a scaffold from the association of several biomaterials, resulting in a three-dimensional environment in which the cells could colonize, proliferate and differentiate into the osteogenic lineage. *In vivo* testing indicates the possibility of using this scaffold for bone tissue replacement. Thus, the scaffold produced represents an interesting system for the cultivation of mesenchymal stem cells for mimicking native bone tissue that can be used for restoration when applied in regenerative medicine.

## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Figura 1:</b> Aspecto do hidrogel de alginato após processo de reticulação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).....	1
8	
<b>Figura 2:</b> Equipamento de impressão tridimensional Fab@CTI(a) e o cabeçote de impressão desenvolvido pelo Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer para extrusão de filamentos termoplásticos poliméricos (b) (retirado, com autorização, de MAURMANN <i>et al.</i> , 2017)..	19
<b>Figura 3:</b> Diagrama esquemático da técnica de eletrofiação utilizada na produção das nanofibras de policaprolactona (adaptado de MAURMANN <i>et al.</i> , 2017)	21
<b>Figura 4.</b> Aspecto visual da biocerâmica utilizada na composição dos <i>scaffolds</i> (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS)..	22
<b>Figura 5:</b> Visão macroscópica dos hidrogéis de alginato formados após a reticulação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS)..	30
<b>Figura 6:</b> Aspecto macroscópico das estruturas de policaprolactona obtidas a partir da técnica de eletrofiação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).	30
<b>Figura 7:</b> Aspecto macroscópico das estruturas de policaprolactona obtidas a partir da impressão tridimensional (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS)..	31
<b>Figura 8:</b> Diagrama esquematizado do processo de produção da biocerâmica utilizada (retirado de MAURMANN <i>et al.</i> 2018)..	32
<b>Figura 9:</b> Modelo experimental com lesões de 5mm na calota craniana de ratos. No lado direito o controle (apenas lesão) e no lado esquerdo o grupo contendo os biomateriais (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).	34

**Figura 10:** Morfologia das células-tronco mesenquimais aderidas a placa de cultivo..

35

**Figura 11:** Perfil imunofenotípico de células-tronco mesenquimais analisadas por citometria de fluxo. Controles isotípicos (A). Baixa taxa de expressão para CD14, CD43, CD45 e CD 184, marcadores hematopoéticos característicos (B) e alta de marcadores mesenquimais (acima de 99,7%) para CD44, CD73, CD90, CD23 e CD105 (C) (retirado de BRIÃO, 2017)..

37

**Figura 12:** Diferenciação de células-tronco mesenquimais. Fotografias sob aumento de 100x, exceto adipogênica, na qual foi utilizado aumento de 200x. (A, B e C) Controles de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, respectivamente. (D) Diferenciação adipogênica, (E) Diferenciação condrogênica, (F) Diferenciação osteogênica (retirado de BRIÃO, 2017)

38

**Figura 13:** Aspecto macro e microscópico dos biomateriais. (A) *Scaffolds* de PCL obtidos por eletrofiação e (B) e dos filamentos dos impressos 3D. (C) Aspecto de alginato (Alg) por microscopia eletrônica de transmissão (890X), adaptado de Maurmann, 2016. (D) Aspecto da biocerâmica. (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

40

**Figura 14:** Histograma mostrando o diâmetro das nano e microfibras de PCL obtidas por eletrofiação..

41

**Figura 15:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em contato com a biocerâmica. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

42

**Figura 16:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em hidrogéis de 2,5% de alginato com diferentes solventes. Dados expressos em média e desvio padrão..

43

**Figura 17:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em hidrogéis de 2,5% ou 3% de alginato em água. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (\*).

44

**Figura 18:** Resultado do cultivo de células em hidrogéis de alginato após 1 e 20 dias. Em vermelho os dados referentes ao hidrogel produzido por deposição manual e em azul a partir do processo de bioimpressão. Dados expressos em média e

desvio padrão. Resultados com  $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos (\*\*).. 45

**Figura 19:** Aspecto do hidrogel de alginato produzido por (a) deposição manual e (b) bioimpressão 46

**Figura 20:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em hidrogéis de alginato, fibras de policaprolactona ou impressos tridimensionais de policaprolactona isoladamente ou em associação. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos 47

**Figura 21:** Avaliação qualitativa da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais cultivadas em hidrogéis de alginato associados a policaprolactona em estruturas tridimensionais e fibras obtidas por eletrofiação. 48

**Figura 22:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em *scaffolds* compostos por hidrogel de alginato, nanofibras de policaprolactona, impressos tridimensionais de policaprolactona e biocerâmica para avaliação do momento de reticulação em duas linhagens celulares. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos 49

**Figura 23:** Diferenciação osteogênica de SHED. Controle não diferenciado (A), diferenciação na placa de cultura (B), com 1mg/ml de BC (C), em alginato (D), em matrizes de PCL impressa tridimensionalmente (E), em PCL eletrofiado (F) e em todos (G). 50

**Figura 24:** Aspecto de três calotas após fixação e decalcificação. No lado esquerdo de cada calota o grupo controle e os biomateriais no lado direito 50

**Figura 25:** Histologia do tecido ósseo corado por hematoxilina e eosina (HE) Grupo controle (A) e grupo contendo *scaffolds* (B). Aumento de 75x. 51

Tabela 1. Porcentagens de cada marcador utilizado no ensaio imunofenotípico por citometria de fluxo das células utilizadas no estudo (dados mostrados de 2 linhagens celulares utilizadas). 39

## Lista de abreviaturas

°C – Graus Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetros

µM – Micromolar

3D – Três dimensões

7AAD – do inglês *7-Amino Actinomycin D*

Alg – Alginato

ANOVA – Análise de variância de uma via

APC – do inglês *Allophycocyanin*

AsAP – Ácido ascórbico-2 fosfato

atm – Atmosfera

BC – Biocerâmica

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio

Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD105 – do inglês *Cluster of Differentiation 105*

CD14 – do inglês *Cluster of Differentiation 14*

CD184 – do inglês *Cluster of Differentiation 184*

CD29 – do inglês *Cluster of Differentiation 29*

CD34 – do inglês *Cluster of Differentiation 34*

CD44 – do inglês *Cluster of Differentiation 44*

CD45 – do inglês *Cluster of Differentiation 45*

CD73 – do inglês *Cluster of Differentiation 73*

CD90 – do inglês *Cluster of Differentiation 90*

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetros

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

CTI – Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer

CTM – Células-tronco mesenquimais

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ES – do inglês *Electrospinning*

FDA – do inglês *Food and Drug Administration*

FINEP – Financiadora de Estudos e Projetos

FITC – do inglês *Fluorescein isothiocyanate*

h – Horas

HE – Hematoxilina e eosina

IBMX – 3-isobutil-1-metilxantina

IPCT – Instituto de Pesquisa com Células-tronco

ISCT – do inglês *International Society for Cellular Therapy*

ITS – Insulina humana recombinante

kg – Quilograma

kV – Quilovolt

M – Molar

mg – Miligrama

microRNA – Micro ácido ribonucleico

min – Minutos

mL – Mililitro

mm – Milímetros

mM – Milimolar

MPa – Megapascal

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]

NaCl – Cloreto de sódio

ng – Nanograma

nm – Nanômetros

O.C.T. – Temperatura ótima de corte

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCL – Policaprolactona

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – do inglês *phycoerythrin*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

RGD – Sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico

SFB – Soro Fetal Bovino

SHED – do inglês stem cells from human exfoliated deciduous teeth

TCC – Trabalho de Conclusão de Curso

TGF- $\beta$ 1 – do inglês *Transforming growth factor beta 1*

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	HIPÓTESE	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo Principal	25
3.2	Objetivos Específicos	25
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais	26
4.2	Caracterização das células-tronco mesenquimais	27
4.2.1	Análise morfológica das culturas celulares	27
4.2.2	Análise imunofenotípica das células cultivadas	27
4.3	Diferenciação celular <i>in vitro</i>	28
4.3.1	Diferenciação osteogênica	28
4.3.2	Diferenciação condrogênica	28
4.3.3	Diferenciação adipogênica	29
4.4	Obtenção de hidrogéis de alginato	29
4.5	Obtenção de estruturas fibrosas de policaprolactona	30
4.6	Obtenção de matrizes tridimensionais de policaprolactona	31
4.7	Obtenção da biocerâmica	31
4.8	Cultivo de SHED em diferentes <i>scaffolds</i>	32
4.9	Análises de viabilidade celular	33
4.10	Teste piloto <i>in vivo</i>	33
4.11	Análise estatística	34
5.	RESULTADOS	35
5.1	Caracterização das SHED	35
5.1.1	Caracterização morfológica	35
5.1.2	Caracterização imunofenotípica	36
5.1.3	Ensaio de diferenciação	38
5.2	Caracterização dos biomateriais	38
5.2.1	Aspectos macro e microscópicos dos biomateriais avaliados	39

5.3	Análises de viabilidade celular	41
5.3.1	Biocerâmica (BC)	41
5.3.2	Alginato	42
5.3.3	Alginato e policaprolactona	46
5.3.4	Otimização do processo de obtenção do <i>scaffold</i> final	48
5.3.5	Diferenciação osteogênica das células-tronco nos biomateriais	49
5.4	Estudo piloto <i>in vivo</i>	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	59
8	PERSPECTIVAS	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXO	70

## 1. Introdução

O corpo humano adulto é constituído classicamente por 206 ossos, os quais proporcionam suporte estrutural para os demais tecidos, estando assim ligados à movimentação corporal e a proteção de órgãos vitais. Além disso, o mesmo está amplamente relacionado à manutenção de homeostase mineral e ao equilíbrio ácido-base, armazenagem dos fatores de crescimento e citocinas, além de conter nichos para o armazenamento e proliferação de células-tronco mesenquimais importantes para a hematopoese (TAICHMAN, 2005).

Os ossos são constituídos, em cerca de 25% de seu peso, por uma matriz orgânica majoritariamente composta por colágeno do tipo I, proteoglicanos de baixa massa molecular e proteínas não colágenas. A porção inorgânica óssea, que corresponde a 65% da estrutura do tecido, é formada por uma matriz mineral cujo componente mais prevalente é a hidroxiapatita, e os 10% restantes correspondem a água (JUNQUEIRA *et al.*, 2017).

O tecido ósseo é dividido entre osso compacto e trabecular no que concerne a sua forma macroscópica, cujas propriedades mecânicas variam de acordo com a idade. A porção compacta é responsável pela resistência e a proteção, sendo reportado o valor de força de compressão como 130-180 MPa, o que permite que o osso suporte as cargas e a tração. Já o osso trabecular exibe valores de 4-12 MPa, sendo esse mais envolvido com as funções metabólicas do tecido e com a produção de células hematopoéticas (REZWAN *et al.*, 2006).

As fraturas ósseas representam um grande problema de saúde no contexto nacional. A perda do tecido ósseo ocasiona grandes prejuízos na vida dos pacientes, que perdem qualidade de vida e, muitas vezes, capacidade de atuar no mercado de trabalho, além de um grande impacto econômico e no sistema de saúde. Os dados do DATASU demonstram a ocorrência de 582.768 lesões ósseas no ano de 2016, 560.166 em 2017 e 576.509 em 2018 (Portal da Saúde), evidenciando assim a alta taxa de incidência de fraturas ósseas na população brasileira.

Essas lesões são originadas por várias razões, desde trauma por acidente e complicações decorrentes de cirurgias ortopédicas (PAPE, 2002), doenças do tecido ósseo como osteogênese imperfeita (TAUER, 2019), osteoartrite (NEOGI,

2013) e osteoporose (MITXITORENA, 2019), bem como ressecção por tumores primários (PHUKAN, 2015; MCGOVERN, 2018).

No âmbito clínico, o tratamento para fraturas ósseas é normalmente conduzido a partir da imobilização do tecido lesado a partir do uso de gesso, enxertos, normalmente advindos da crista íliaca do próprio paciente (GIANNOUDIS, 2005) ou da implantação de próteses, nos casos mais graves (BENEGAS et al., 2007). O implante de próteses não biodegradáveis, como as de titânio, tem sido amplamente utilizado para a restauração da função óssea, ainda que não seja exatamente um promotor da regeneração funcional do tecido nativo. A adição de membranas colágenas ou a modificação química no entorno dessas próteses tem sido útil para a regeneração óssea guiada, porém esses materiais não são biodegradáveis, então novas técnicas devem ser utilizadas para superar esse ponto (ELGALI, 2019).

A engenharia tecidual visa a mimetização dos tecidos de ordem biológica, no intuito de reproduzir, *in vitro*, as características morfofisiológicas dos tecidos nativos. Esses tecidos produzidos artificialmente têm como propósito servir como substitutos biotecnológicos para tecidos ou órgãos danificados (LEITE; VASCONCELOS, 2007). Para a construção dessas estruturas, a engenharia tecidual baseia-se na união de uma tríade de fatores: células, biomateriais e fatores bioativos (LANGER; VACANTI, 1993).

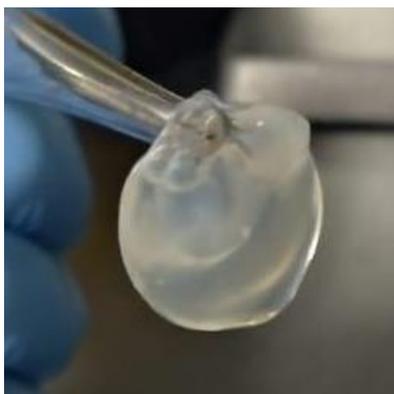
Paralelamente, a medicina regenerativa busca o reparo de componentes biológicos acometidos por distúrbios morfológicos ou funcionais. Para isso, diversos sistemas de tratamento têm sido pesquisados utilizando diferentes materiais ou componentes biológicos para a restauração da função tecidual, sendo que o primeiro artigo reportado dessa área foi referente ao uso de plasma rico em plaquetas em cirurgias orais e maxilares para a regeneração óssea (WHITMAN, 1997).

Nesse contexto, a engenharia de tecidos, aplicada à medicina regenerativa, visa a construção *in vitro* de substitutos para tecidos ou órgãos lesados. As células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados (SHED - do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) são um tipo de células-tronco mesenquimais (CTM) que vêm sendo aplicadas na engenharia tecidual por suas capacidades de

autorrenovação e diferenciação em outros tipos celulares, podendo assim originar diversos tecidos, dentre estes, o tecido ósseo (ZHANG; KOHN, 2012).

Os biomateriais são empregados visando prover suporte estrutural necessário para que células possam colonizar e formar tecidos. Esses materiais podem ser subdivididos em três grandes grupos: biocerâmicas, polímeros naturais e polímeros sintéticos (O'BRIEN, 2011). A partir do uso desses materiais podem ser construídos os *scaffolds*, os quais são estruturas tridimensionais que objetivam mimetizar a matriz extracelular para que as células sejam cultivadas em ambientes semelhantes aos encontrados nos tecidos vivos (NAKASHIMA; AKAMINE, 2005).

O alginato é um polissacarídeo natural aniônico extraído da parede celular de diversas espécies de algas marrons (classe *Phaeophyceae*), como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (LEE; MOONEY, 2012). Esse polímero natural de alto peso molecular é composto por diferentes combinações dos monômeros  $\alpha$ -L-gulurônicos e  $\beta$ -D-manurônicos, não havendo assim uma padronização na produção de alginato, uma vez que o teor de cada monômero e a composição estrutural e disposição dos blocos de monômeros é variável (MÜLLER et al., 2011). O alginato possui biocompatibilidade e baixa toxicidade para as células humanas, sendo empregado na formação de hidrogéis tridimensionais para posterior utilização na engenharia tecidual. Para a formação dos hidrogéis, a gelificação é um processo importante, para a qual é necessário que haja a adição de um cátion bivalente, como o cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), bário ( $\text{Ba}^{2+}$ ) ou o zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), em pH próximo a 6, resultando na reticulação e enrijecimento do biomaterial e a consequente manutenção da forma tridimensional (LEE; MOONEY, 2012). A figura 1 demonstra o aspecto característico do hidrogel de alginato reticulado.



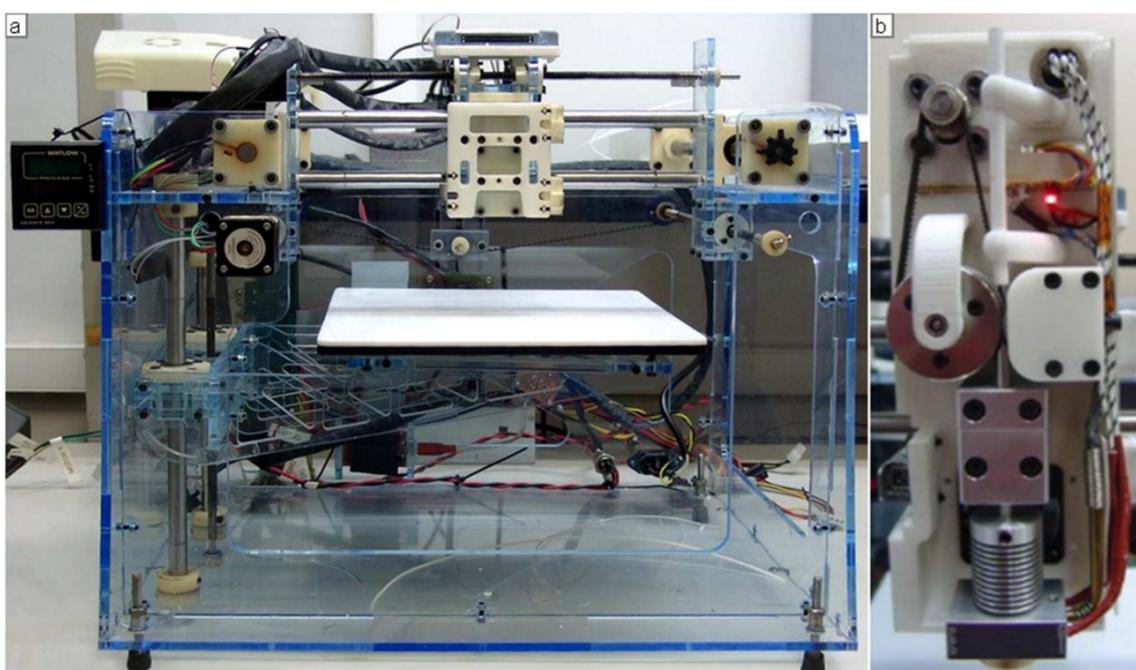
**Figura 1:** Aspecto do hidrogel de alginato após processo de reticulação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

As aplicações do alginato na engenharia tecidual são bastante amplas (VENKATESAN *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2019), variando desde a produção de nanofibras de alginato com ácido polilático obtidas por *electrospinning* (XU *et al.*, 2017), produção de hidrogéis injetáveis de alginato com peptídeos (GHOSH *et al.*, 2019), bem como sua utilização em associação com gelatina e biovidro para a formação de *scaffolds* (ORSHESH *et al.*, 2019).

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático com propriedades de biocompatibilidade e degradabilidade *in vivo*, além de uma excelente estabilidade térmica. Esse polímero sintético tem sido amplamente utilizado para aplicações de medicina regenerativa e é aprovado pelo órgão regulatório americano *Food and Drug Administration* (FDA) (ABEDALWAFI *et al.*, 2013). A policaprolactona pode ser submetida a diversas técnicas na produção de *scaffolds* para a engenharia tecidual, bem como pode ser aliada a outros materiais na produção de biomateriais compósitos (SIDDIQUI *et al.*, 2018).

A rigidez das estruturas de policaprolactona tem sido observada com vistas à utilização na produção de *scaffolds* para o tecido ósseo. Dependendo dos parâmetros como forma, número de camadas, tamanho do constructo e espaçamento entre filamentos, é possível modular a força mecânica resultante. As estruturas utilizadas no presente trabalho foram previamente caracterizadas e avaliadas, sendo reportado no estudo os valores de  $28,2 \pm 3,5$  MPa na medição da força mecânica (CUNHA *et al.*, 2019). Ainda que esses números estejam acima do previamente comentado como normal para a estrutura óssea natural, a literatura relata que valores entre 20 e 141 MPa estão contidos na faixa ideal para *scaffolds* ósseos (GOONOO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2002).

Dentre as diversas formas de produzir os biomateriais ósseos utilizando a policaprolactona, há a manufatura aditiva, popularmente conhecida como “impressão 3D”, na qual filamentos do polímero são impressos em um padrão pré-definido utilizando modelos matemáticos formulados utilizando um *software* de um computador conectado à máquina. Com a impressão 3D, é possível controlar fatores como pressão, temperatura e velocidade de impressão, assim como a altura, distância entre filamentos e número de camadas a serem impressas da estrutura desejada (VALAINIS *et al.*, 2019). A figura 2 mostra o equipamento empregado na confecção dos impressos 3D utilizados no presente trabalho.

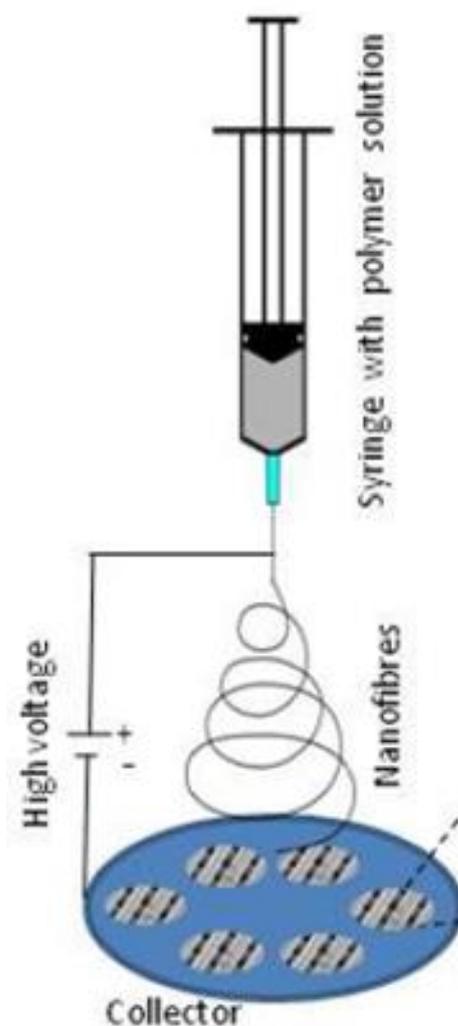


**Figura 2:** Equipamento de impressão tridimensional Fab@CTI(a) e o cabeçote de impressão desenvolvido pelo Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer para extrusão de filamentos termoplásticos poliméricos (b) (retirado, com autorização, de MAURMANN *et al.*, 2017).

As estruturas projetadas são obtidas e podem ser utilizadas na engenharia tecidual, tanto referente a tecidos rígidos, como o ósseo (SZOJKA *et al.*, 2017), quanto para outros menos resistentes, como a cartilagem (THEODORIDIS *et al.*, 2018). Ademais, os impressos 3D podem servir também como um método para liberação controlada de fármacos ou como carreador de moléculas bioativas, o que é de grande interesse para a engenharia tecidual (FU *et al.*, 2018).

Adicionalmente, é possível imprimir estruturas contendo células vivas, na chamada bioimpressão, em contraponto ao sistema de manufatura comum, na qual apenas após as estruturas estarem prontas é possível semear e cultivar as células de interesse. Para isso, biotintas têm sido desenvolvidas a partir de, por exemplo, a dispersão de células animais em hidrogéis (CHIMENE *et al.*, 2019).

Paralelamente, o uso de nano e microfibras obtidas a partir da técnica de eletrofiação (ES, do inglês *electrospinning*) tem demonstrado grandes avanços na engenharia tecidual. A mimetização da estrutura fibrilar da matriz extracelular proporciona uma maneira para a organização, adaptação e funcionamento das células cultivadas (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011). O funcionamento da técnica dá-se a partir da aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre a ponta da agulha encaixada na seringa, contendo a solução polimérica a ser utilizada, e a placa coletora, posicionada a uma distância pré-estabelecida. Quando a solução é forçada para fora da seringa, a deformação que o campo elétrico ocasiona na gota presente na ponta da agulha faz com que sejam formadas fibras que caem em movimento de “chicoteamento”, as quais são depositadas na placa coletora (STEFFENS *et al.*, 2018). A figura 3 mostra esquematicamente a configuração do equipamento de eletrofiação.



**Figura 3:** Diagrama esquemático da técnica de eletrospinning utilizada na produção das nanofibras de policaprolactona (adaptado, com autorização de MAURMANN *et al.*, 2017).

Estruturas fibrosas de policaprolactona têm sido amplamente usadas no âmbito da engenharia tecidual óssea, desde seu uso como suporte para células, estando ou não combinado com outros materiais (LIN *et al.*, 2019). Além disso, esses biomateriais são passíveis de adição de fatores bioativos, como micro RNAs para o incremento da diferenciação osteogênica (TAHMASEBI *et al.*, 2019).

Os materiais biocerâmicos são compostos inorgânicos capazes de se integrar à matriz orgânica. A figura 4 demonstra o aspecto visual da biocerâmica utilizada no presente trabalho. Essa classificação dispõe de subclasses, tais como os biovidros. O biovidro 45S5 BG (composto por 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 24,5%

Na<sub>2</sub>O e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) foi o primeiro biovidro capaz de unir-se ao tecido ósseo nativo a partir da formação de uma camada de hidroxiapatita em sua superfície (HENCH, 1991). As biocerâmicas possuem características de osteointegração, unindo-se à matriz nativa, osteocondução, orientando o sentido de deposição da hidroxiapatita a ser formada, além de apresentarem uma baixa ativação da resposta imune (LEVENGGOOD; ZHANG, 2014).



**Figura 4:** Aspecto visual da biocerâmica utilizada na composição dos *scaffolds* (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

A presença de silício e cálcio na composição dos materiais biocerâmicos faz com que, devido a degradação do material, esses íons sejam liberados para o meio extracelular, onde atuam na formação da matriz extracelular (AZEENA *et al*, 2016). O cálcio é utilizado na síntese de hidroxiapatita e o silício na síntese e estabilização da matriz de colágeno que compõe a porção orgânica (JUGDAOHSINGH, 2007).

Esses biomateriais são altamente semelhantes à matriz inorgânica do osso em composição. Com isso, essa classe de materiais tem sido amplamente utilizada na engenharia tecidual, voltada para a regeneração do tecido ósseo (ZHU *et al.*, 2011; EL-FIQI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; KAUR *et al.*, 2019).

Nos sistemas 3D, é possível mimetizar respostas fisiológicas de forma mais fiel ao tecido nativo, quando comparados aos sistemas bidimensionais. Isto ocorre a partir da replicação das condições referentes à morfologia, interações

intercelulares e extracelulares, diferenciação celular, polarização da migração e comportamento celular encontrados *in vivo* (EDMONDSON *et al.*, 2014). Sendo assim, a estrutura dos biomateriais nos quais as células serão cultivadas, acaba por exercer uma grande influência no trânsito de nutrientes, metabólitos e moléculas regulatórias, entre o meio extracelular e o interior das células (VENUGOPAL *et al.*, 2012).

Considerando a complexidade estrutural do tecido ósseo, os trabalhos científicos têm reportado o uso de múltiplos biomateriais para suprir as diferentes necessidades para a mimetização mais adequada do tecido ósseo. A tendência dos estudos aponta para a utilização da tecnologia de impressão 3D modificada com hidroxiapatita (BUYUKSUNGUR *et al.*, 2017), nanofibras associadas a biocerâmicas (HEYDARI *et al.* 2017), bem como a combinação de polímeros naturais, sintéticos e biocêramicas, utilizando estruturas 3D, biovidros, alginato e gelatina na formação de *scaffolds* (MAO *et al.*, 2018), dentre outros sistemas relatados.

Dessa forma, a associação dos materiais supracitados pode representar uma boa estratégia no que concerne à produção de *scaffolds*, nos quais as células-tronco mesenquimais possam ser cultivadas, para posterior uso na medicina regenerativa referente ao tecido ósseo.

## **2. Hipótese**

Obtenção de *scaffolds* funcionais produzidos a partir da combinação de biomateriais poliméricos e cerâmicos, os quais possam ser posteriormente associados às células-tronco e aplicados na regeneração óssea, mantendo sua viabilidade celular durante o cultivo.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo principal**

Desenvolver *scaffolds* para uso em associação com células-tronco mesenquimais provenientes de dentes decíduos esfoliados humanos, visando posterior aplicação na medicina regenerativa relacionada ao tecido ósseo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Associar estruturas de policaprolactona obtidas por impressão 3D a redes nano e microestruturadas produzidas a partir de eletrofição, para conferir maior resistência mecânica à tração que o osso precisa suportar;
- Combinar as estruturas supracitadas com hidrogéis de alginato, bem como a biocerâmicas capazes de aumentar a viabilidade de células-tronco e mimetizar a porção inorgânica da matriz extracelular óssea nativa;
- Testar a funcionalidade dos *scaffolds* produzidos a partir da associação dos biomateriais com células-tronco mesenquimais (CTM).
- Diferenciar as CTM sobre os biomateriais *in vitro*.
- Testar os biomateriais em modelos *in vivo*.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais

A partir de uma parceria com a Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS, as células-tronco utilizadas nesse estudo foram originadas de dentes decíduos humanos esfoliados de pacientes, através da coleta após assinatura de termo de consentimento livre pelo paciente ou seu responsável, após aprovação no Comitê de Ética (CAAE nº 36403514.6.0000.5347). Foram utilizadas duas linhagens distintas durante o estudo, cada uma advinda de um paciente.

As células foram isoladas em cabines de fluxo laminar, minimizando os riscos de contaminação exógena. O isolamento celular iniciou-se com a remoção da polpa dental do tecido dentário com o auxílio de uma colher de dentina. Em seguida, o tecido pulpar foi imerso em uma solução de colagenase com concentração 0,2% (Gibco®) e incubado a 37°C por 60 minutos. Sucessivamente, ocorreu a centrifugação da amostra a 800g durante 10 minutos, resultando em um *pellet* de células que foi ressuspensão em 1mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®). Por fim, a solução composta das células isoladas e do meio de cultivo foi semeada em placas de cultivo e acondicionada em uma incubadora umidificada a 37°C e com teor de 5% de CO<sub>2</sub> por aproximadamente 72 horas. Posteriormente, as células não aderidas à placa foram descartadas durante a troca do meio de cultura. Subsequentemente, o meio de cultivo das células isoladas foi trocado a cada 3-4 dias (BERNARDI *et al.*, 2011).

No momento em que a confluência desejada foi atingida, as células cultivadas foram submetidas à lavagem com solução tampão fosfato (PBS), seguido de tripsinização durante 3 minutos a 37°C, em uma solução de 0,05% de tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich®) diluída em PBS. Em seguida, para inativar a ação da tripsina, foi adicionado meio de cultivo DMEM contendo SFB e as células foram transferidas para novas garrafas de cultivo na densidade de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, visando o crescimento da cultura celular. As sub-culturas foram estabelecidas de modo similar ao descrito acima, conforme atingiam a confluência nas garrafas de cultivo utilizadas no estudo.

## 4.2 Caracterização das SHED

### 4.2.1 Análise morfológica das culturas celulares

Uma das análises das células-tronco cultivadas foi realizada através da sua morfologia, caracterizada pelo formato fibroblastóide natural, e capacidade de adesão à placa de cultivo. Tais parâmetros foram avaliados de forma rotineira a partir da observação das culturas em um microscópio invertido de contraste de fase Olympus CKX41 durante todo o período de cultivo.

### 4.2.2 Análise imunofenotípica das células cultivadas

Sob outra perspectiva, a caracterização imunofenotípica das células foi avaliada através da presença de marcadores moleculares característicos de células-tronco mesenquimais e ausência de marcadores característicos de células hematopoéticas, através da técnica de citometria de fluxo (KOBOLAK *et al.*, 2016). Atingida a quinta passagem, 100.000 células provenientes do isolamento de um dente foram utilizadas juntamente com anticorpos específicos para a verificar a expressão de marcadores de CTMs, como CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Do mesmo modo, para assegurar a ausência de marcadores de células-tronco hematopoéticas, utilizou-se os marcadores CD14, CD34, CD45 e CD184 (MAURMANN *et al.*, 2017). Para tal propósito, as células cultivadas foram incubadas por 30 minutos no abrigo da luz com 2µL de anticorpo monoclonal anti-humano (Pharmingen, Becton Dickinson, San Jose, CA) para examinar a presença de cada uma das moléculas citadas anteriormente. Posteriormente, as células foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS. Ademais, foi utilizado o reagente 7AAD (7-Amino Actinomicina D) (Molecular Probes, Eugene), na concentração final de 1µg/mL em PBS, como parâmetro exclusivo, propiciando apenas a avaliação de células viáveis. As células foram incubadas, juntamente com o reagente, por 30 minutos à temperatura ambiente e analisadas no citômetro de fluxo FACSAria III (BD Biosciences). Considerando o tamanho e a complexidade celular da amostra analisada, o equipamento foi previamente ajustado para as condições de análise desejadas. O ajuste da fluorescência foi efetuado através dos controles isotópicos APC (do inglês *allophycocyanin* - alofococianina), FITC (do inglês *fluorescein*

*isothiocyanate* – isotiocianato de fluoresceína) e PE (do inglês *phycoerythrin* - ficoeritrina). Desse modo, os dados da análise foram adquiridos de aproximadamente 10.000 eventos para cada amostra e posteriormente analisados no *software* FACSDiva versão 6.0 (BD Biosciences).

### **4.3 Diferenciação celular *in vitro***

Para constatar a identidade das células isoladas, há a necessidade da realização de testes de diferenciação para comprovar a capacidade dessas em dar origem a diferentes tipos celulares adultos, podendo assim ser caracterizadas como células-tronco mesenquimais (DOMINICI *et al.*, 2006). Assim sendo, utilizando uma cultura celular com 6 poços de repetição foram realizados ensaios de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica em células cultivadas, na quinta passagem, empregando meios de cultivo característicos para cada indução de diferenciação, que foram trocados a cada 3-4 dias, durante 3-4 semanas (BERNARDI *et al.*, 2011). As células foram lavadas com tampão fosfato, fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com água milli-Q e coradas com a coloração específica de cada teste para confirmação da diferenciação, no tempo de diferenciação e nos parâmetros de morfologia adequados (MAURMANN *et al.*, 2017; SIQUEIRA *et al.*, 2017).

#### **4.3.1 Diferenciação osteogênica**

A análise de diferenciação osteogênica foi elaborada a partir do cultivo das células-tronco mesenquimais, utilizando meio de cultivo osteogênico composto-se de DMEM de baixa glicose, SFB (15%), dexametasona ( $10^{-1}$  mM), ácido ascórbico 2-fosfato (50mM) e  $\beta$ -glicerofosfato (15mM), ao longo de 25 dias. Subsequentemente, utilizou-se a coloração de *Alizarin Red S* em pH 4,2 para a confirmação da diferenciação óssea, através da deposição de cálcio na matriz mineralizada.

#### **4.3.2 Diferenciação condrogênica**

O procedimento empregado na análise de diferenciação condrogênica baseou-se no cultivo das SHED ao longo de 30 dias em meio condrogênico, constituído por DMEM de baixa glicose suplementado com SFB (10%),

dexametasona (0,1 $\mu$ M), ITS 1x (0,01mg/mL de insulina humana recombinante, 5,5 $\mu$ L/mL de transferrina humana, e 5ng/mL de selenito de sódio), 10ng/mL de TGF-1 e 50 $\mu$ M da solução de ácido ascórbico-2 fosfato (AsAP). A condrogênese foi avaliada nas células fundamentada na coloração das glicosaminoglicanas com o reagente *Alcian Blue*.

#### 4.3.3 Diferenciação adipogênica

A avaliação referente a diferenciação adipogênica foi efetuada com base no cultivo das SHED por um período de 30 dias em meio adipogênico, constituído por DMEM suplementado com SFB (10%), 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) (0,5mM), dexametasona (1 $\mu$ M), insulina (1,74 $\mu$ M), indometacina (50 $\mu$ M), rosiglitazona (1 $\mu$ M). A adipogênese foi avaliada nas células fundamentada no reconhecimento de gotículas de gordura em microscópio de contraste de fase e coloração por *Oil Red O*.

#### 4.4 Obtenção de hidrogéis de alginato

Foram utilizadas soluções de alginato sódico (Sigma-Aldrich®, nº W201502 e MKBB8171) nas concentrações 2,5% ou 3%. A massa ideal do biopolímero para cada concentração foi dispersa em água, PBS ou solução salina com TRIS e essa foi esterilizada por calor úmido em autoclave a 1 atm durante 18 minutos. As soluções foram mantidas a 4°C até a utilização. Durante os experimentos, utilizando a deposição manual com seringa de 1mL, foi efetuado o processo de reticulação a partir da exposição das soluções a cloreto de cálcio (50mM), durante 30 minutos, sendo seguido por duas lavagens com meio DMEM base para que houvesse a remoção do agente reticulante. Houve também a produção de hidrogéis utilizando a Bioimpressora 3D modelo *Octopus* (Soluções em Biotecnologia 3D – 3DBS) na qual, após a deposição automatizada do hidrogel, houve a reticulação seguindo o mesmo protocolo citado acima. A figura 5 ilustra a aparência do hidrogel obtido.



**Figura 5:** Visão macroscópica dos hidrogéis de alginato formados após a reticulação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

#### 4.5 Obtenção de estruturas fibrosas de policaprolactona

Para a obtenção de estruturas nano e microfibrosas de policaprolactona, utilizou-se uma solução de 12% do polímero dissolvida em uma mistura de dimetilformamida e tetrahidrofurano na proporção 7:3. A solução foi armazenada em uma seringa conectada a uma agulha de 21G (0,8x25mm) localizada a 15cm de uma placa coletora. Tanto a agulha quanto a placa coletora foram conectadas a eletrodos que transmitiram voltagens de 20kV (polo positivo) e 1kV (polo negativo), respectivamente, a uma taxa de fluxo de 1,14mL/min. As fibras foram depositadas de maneira aleatória sobre a placa coletora envolta por uma folha de alumínio para facilitar a remoção para posterior esterilização. O referido processo foi executado utilizando a exposição das fibras por 30 minutos a luz ultravioleta em uma cabine de fluxo laminar.

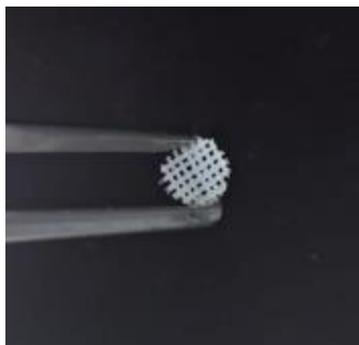
A figura 6 evidencia a estrutura macroscópica obtida na produção das fibras de policaprolactona.



**Figura 6:** Aspecto macroscópico das estruturas de policaprolactona obtidas a partir da técnica de eletrofiação (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

#### **4.6 Obtenção de matrizes tridimensionais de policaprolactona**

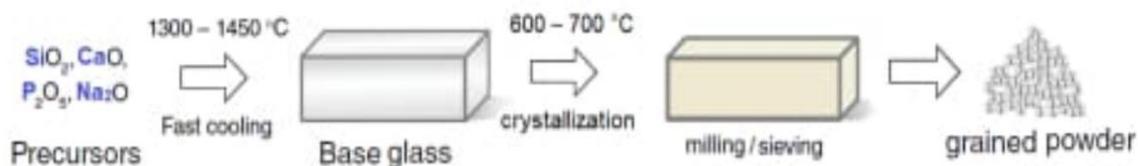
Os suportes de PCL foram fabricados utilizando a impressora 3D do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer. Foi utilizado o equipamento Fab@CTI, o qual produziu as estruturas tridimensionais a partir da extrusão dos filamentos do polímero. As matrizes foram impressas com 2 camadas, sendo cada uma de 0,1mm, e a distância entre essas de 0,5mm, formando um vão para passagem de ar (MAURMANN *et al.*, 2017). Os produtos de impressão foram então cortados em formas circulares de 6mm (Figura 7) e esterilizados utilizando álcool 70% e luz ultravioleta em capela de fluxo laminar.



**Figura 7:** Aspecto macroscópico das estruturas de policaprolactona obtidas a partir da impressão tridimensional (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

#### 4.7 Obtenção da biocerâmica

A biocerâmica foi obtida a partir de uma parceria com o Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos. O material foi produzido usando o sistema  $\text{SiO}_2\text{--CaO--Na}_2\text{O--P}_2\text{O}_5$ , com o método demonstrado na Figura 8. Os precursores foram resfriados rapidamente, formando um vidro base, o qual sofreu o processo de cristalização e moagem, houve então a peneiragem até a obtenção de um pó granulado. Sendo um produto exclusivo e em fase de caracterização, ainda não há uso reportado na literatura quanto a seu uso na regeneração óssea.



**Figura 8:** Diagrama esquematizado do processo de produção da biocerâmica utilizada (retirado de MAURMANN *et al.* 2018).

Após o recebimento das amostras, os materiais foram esterilizados por exposição à luz ultravioleta durante 30 minutos em cabine de fluxo laminar.

#### 4.8 Cultivo das SHED nos diferentes biomateriais

No intuito de produzir *scaffolds* contendo os diversos biomateriais para a melhor mimetização da matriz natural óssea, foram realizados diversos testes de

combinações, usando as SHED. O alginato foi utilizado como a base para formação de um hidrogel tridimensional no qual as células pudessem ser cultivadas em diferentes níveis de altura, mimetizando a estrutura espacial do tecido nativo. A biocerâmica foi adicionada levando em conta a capacidade dessa classe de biomateriais em formar hidroxiapatita, além da liberação de íons necessários à formação da matriz mineralizada do osso. A estrutura de policaprolactona obtida por impressão 3D foi avaliada quanto a sua capacidade de prover suporte mecânico. Paralelamente, as nanofibras do mesmo polímero foram utilizadas para servir como uma membrana que separava o *scaffold* do poço de cultivo, tanto para evitar a passagem das células quanto para atuar como uma base na qual as mesmas possam se aderir e migrar para níveis superiores da estrutura composta. Cada componente foi testado separadamente até a padronização de sua concentração ideal estar concluída e posteriormente iniciou-se a etapa de combinações. Os materiais previamente esterilizados foram acomodados em placas de cultivo de 48 poços e nestes as células foram semeadas e incubadas até a finalização dos respectivos períodos de teste.

#### **4.9 Análises de viabilidade celular**

As análises de viabilidade celular foram executadas a partir do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]), o qual é reduzido a cristais de formazan nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas por enzimas redutases. Cada biomaterial foi analisado separadamente e em associação com os demais, tendo sempre seu desempenho comparado ao resultado da placa de cultivo (grupo controle). Os ensaios foram realizados aplicando sobre as células cultivadas o reagente em uma concentração de 0,25mg/mL, durante 4h de incubação a 37°C. Após, os sobrenadantes dos poços de cultivo foram removidos e foram utilizados dois protocolos para a solubilização dos cristais de formazan. Nos testes com hidrogéis, houve a adição de uma solução de isopropanol e ácido clorídrico 0,04M para a dissolução desses cristais; já nos experimentos sem hidrogéis, foi utilizado diretamente o DMSO. As amostras foram então analisadas

em espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific) e os resultados trabalhados a partir do cálculo de diferença de absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda de 630 e 570 nm (BRIÃO, 2017).

Paralelamente à análise quantitativa, foi realizada uma avaliação qualitativa da viabilidade celular por meio do ensaio de *Live/Dead* utilizando calceína (2 $\mu$ M) e iodeto de propídeo (0,06 $\mu$ M) por 10 minutos para a marcação de células vivas e mortas, respectivamente.

#### 4.10 Teste piloto *in vivo*

Ratos *Wistar* adultos foram utilizados como modelo de estudo pré-clínico, no intuito de avaliar o potencial regenerativo ósseo dos *scaffolds* (aprovação do CEUA em anexo). Para isso, após anestesia geral com xilazina 10mg/kg e cetamina 80mg/kg por via intraperitoneal, duas lesões (5mm cada) foram promovidas na calota craniana utilizando broca trefina (KIM et al., 2010; REZAI-RAD et al., 2015). Os grupos (Figura 9) consistiram em ratos que receberam intervenção cirúrgica e foram testados conforme abaixo:

Grupo 1: Controle – Animais que receberam apenas intervenção cirúrgica, sem o uso de *scaffolds*. n = 3.

Grupo 2: Animais com biomateriais (ES + 3D + Alg + BC) – Animais que receberam os *scaffolds*. n = 3.



**Figura 9:** Modelo experimental com lesões de 5mm na calota craniana de ratos. No lado direito o controle (apenas lesão) e no lado esquerdo o grupo contendo os biomateriais (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

Não foi avaliado um grupo contendo os biomateriais associados às células-tronco pois o intuito do teste piloto foi estabelecer o procedimento cirúrgico e observar apenas a resposta em relação ao *scaffold* construído.

Posteriormente ao implante dos *scaffolds*, a pele dos animais foi suturada e

houve a administração de analgésicos (Ibuprofeno 30mg/kg e Tramadol 5mg/kg) (HRAPKIEWICZ & MEDINA, 2007) durante 3 dias.

Decorridos 45 dias após a fratura, os animais foram eutanasiados por *overdose* de anestésico (xilazina 30mg/kg e cetamina 300mg/kg) e as calotas foram observadas macroscopicamente e histologicamente. Para isso, as amostras foram fixadas, descalcificadas, desidratadas e embebidas em resina O.C.T., cortadas em criostato e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para posterior obtenção de fotografias (ACASIGUA et al., 2014; SHAKIR et al., 2018).

#### **4.11 Análise Estatística**

Os dados obtidos a partir dos experimentos foram tabelados utilizando o *software* Microsoft Office Excel e expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média. A significância estatística foi avaliada a partir do teste de Análise de variância de uma via (ANOVA) com confirmação pelo teste pós-hoc de Tukey HSD utilizando o *software* SPSS (IBM SPSS Statistics 21; SPSS Inc, Chicago, EUA). O valor mínimo de “p” considerado como estatisticamente significativo foi definido como inferior a 0,05 e o intervalo de confiança foi estabelecido em 95%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das SHED

#### 5.1.1 Caracterização morfológica

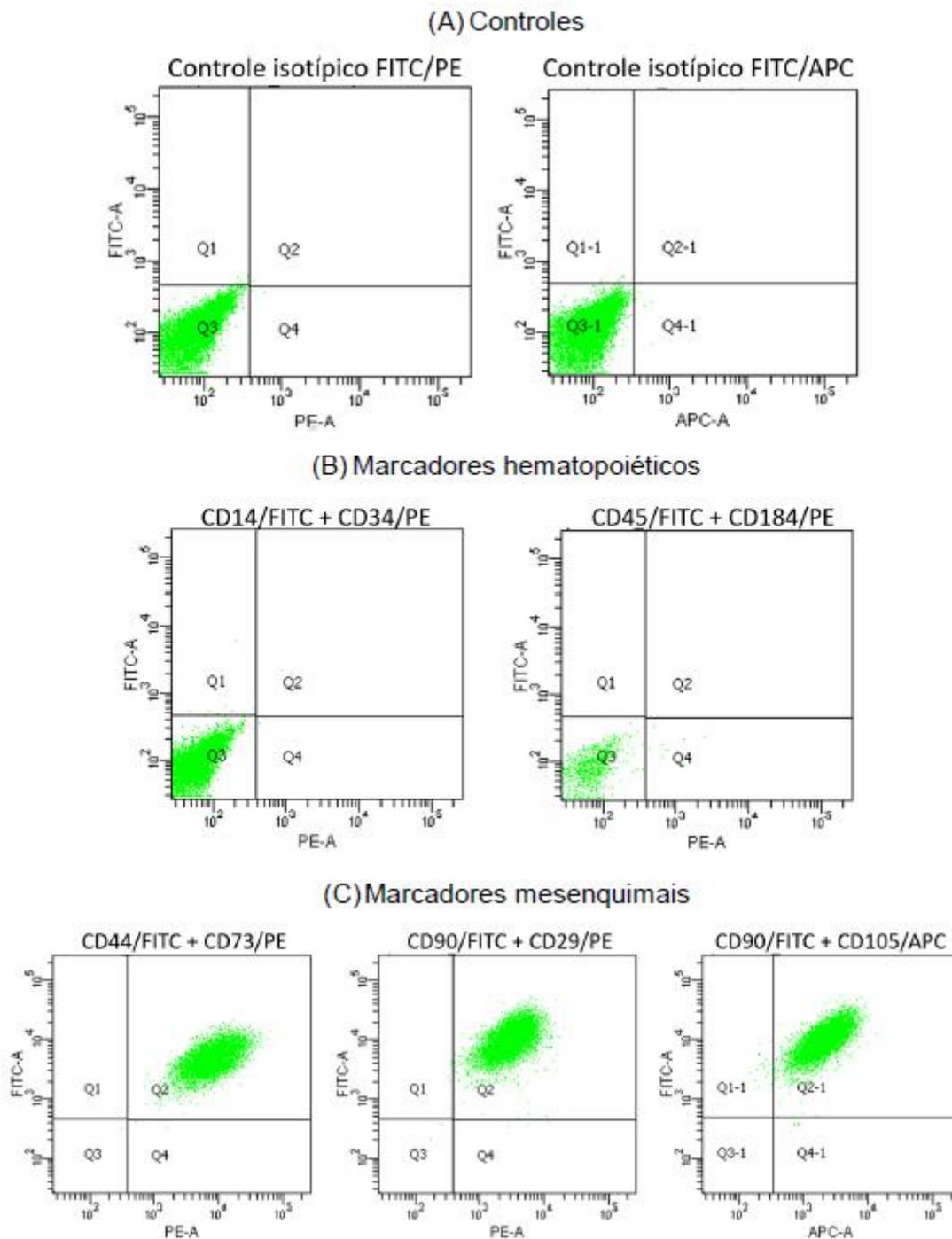
A avaliação de adesividade à placa de cultivo demonstrou a capacidade das células-tronco cultivadas em manter essa ligação ao longo das passagens celulares realizadas durante as semanas de cultivo. Quanto à morfologia, foi observada a manutenção do formato fibroblástico durante todo o período de cultivo, como mostra a Figura 10.



**Figura 10:** Morfologia das células-tronco mesenquimais aderidas a placa de cultivo.

### **5.1.2 Caracterização imunofenotípica**

Os resultados são pertinentes a uma SHED caracterizada previamente no laboratório de pesquisa, todas as culturas celulares utilizadas no presente trabalho foram caracterizadas pelo mesmo protocolo (dados não mostrados). Os resultados obtidos pela técnica de citometria de fluxo demonstraram o perfil imunofenotípico das SHED, caracterizado por altas taxas de expressão de marcadores moleculares associados a células mesenquimais e baixas porcentagens de expressão de marcadores hematopoéticos (Figura 11). Foi observada a presença dos marcadores de células mesenquimais com mais que 90% de positividade, enquanto que a taxa de expressão de marcadores de células hematopoéticas foi inferior a 1%, conforme pode ser observado na tabela 1.



**Figura 11:** Perfil imunofenotípico de células-tronco mesenquimais analisadas por citometria de fluxo. Controles isotípicos (A). Baixa taxa de expressão para CD14, CD43, CD45 e CD184, marcadores hematopoiéticos característicos (B) e alta de marcadores mesenquimais (acima de 99,7%) para CD44, CD73, CD90, CD23 e CD105 (C) (retirado de BRIÃO, 2017).

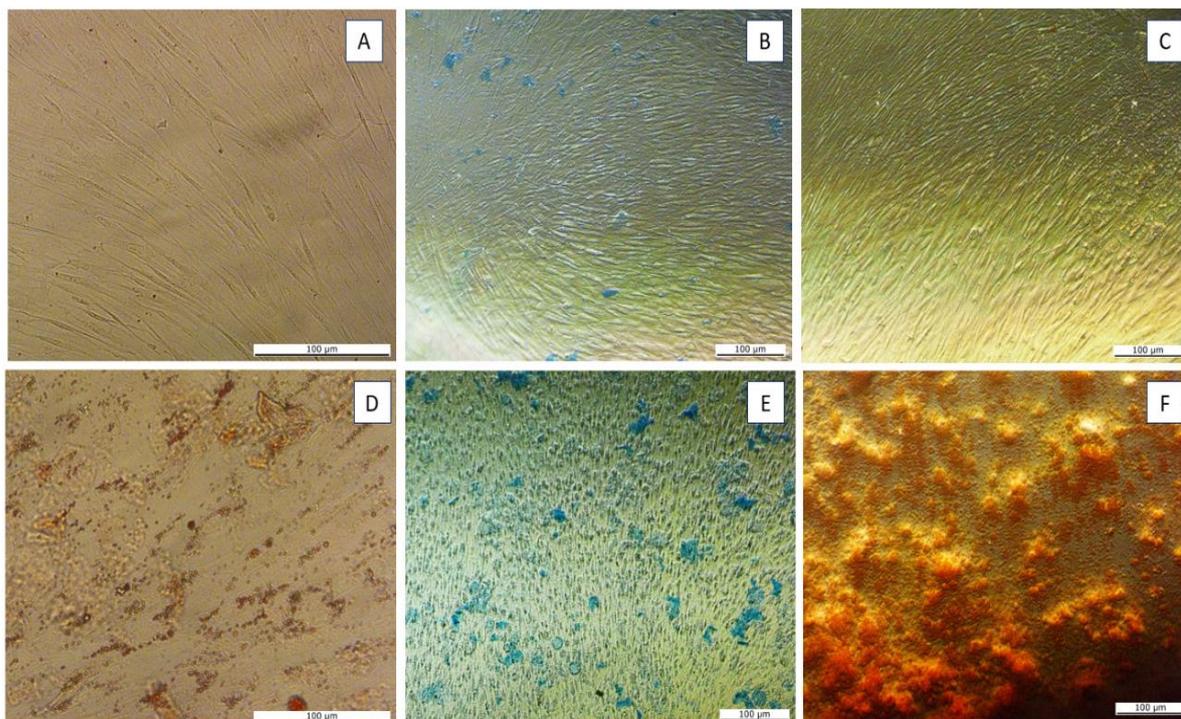
Marcador	Porcentagem de expressão dos marcadores celulares	
	Linhagem celular 1	Linhagem celular 2
CD44	99,8%	99,2%
CD73	99,8%	95,7%
CD90	99,7%	95,3%
CD105	99,7%	81,3%
CD14	0,1%	0,3%
CD34	<0,1%	0,2%
CD45	<0,1%	0,1%
CD184	0,1%	0,1%

Tabela 1. Porcentagens de cada marcador utilizado no ensaio imunofenotípico por citometria de fluxo das células utilizadas no estudo (dados mostrados de 2 linhagens celulares utilizadas).

### 5.1.3 Ensaio de diferenciação

A caracterização por avaliação de diferenciação empregando a coloração específica de cada tipo celular obtido ao fim do processo de diferenciação *in vitro*, confirmou a obtenção das linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica a partir das células-tronco mesenquimais utilizadas. Na figura 12 podemos observar as células-tronco (A, B e C) submetidas a coloração, porém sem marcação. Em vermelho pode-se observar a existência de gotículas de gordura coradas com *Oil Red O* (12D) na cultura de células submetida à diferenciação adipogênica. Do mesmo modo que, em azul, pode-se observar a presença de glicosaminoglicanas coradas com *Alcian Blue* (12E), na cultura induzida à diferenciação condrogênica. A coloração em vermelho mostra a deposição de cálcio nas células cultivadas com o meio osteogênico, observada através da coloração com *Alizarin Red S* (12F).

Portanto, as avaliações por citometria de fluxo e coloração de culturas submetidas à diferenciação *in vitro* atestam a identidade das células-tronco mesenquimais empregadas nesse estudo, destacando a capacidade desse tipo celular de ser manipulado como ferramenta de estudo na engenharia tecidual aplicada à medicina regenerativa.

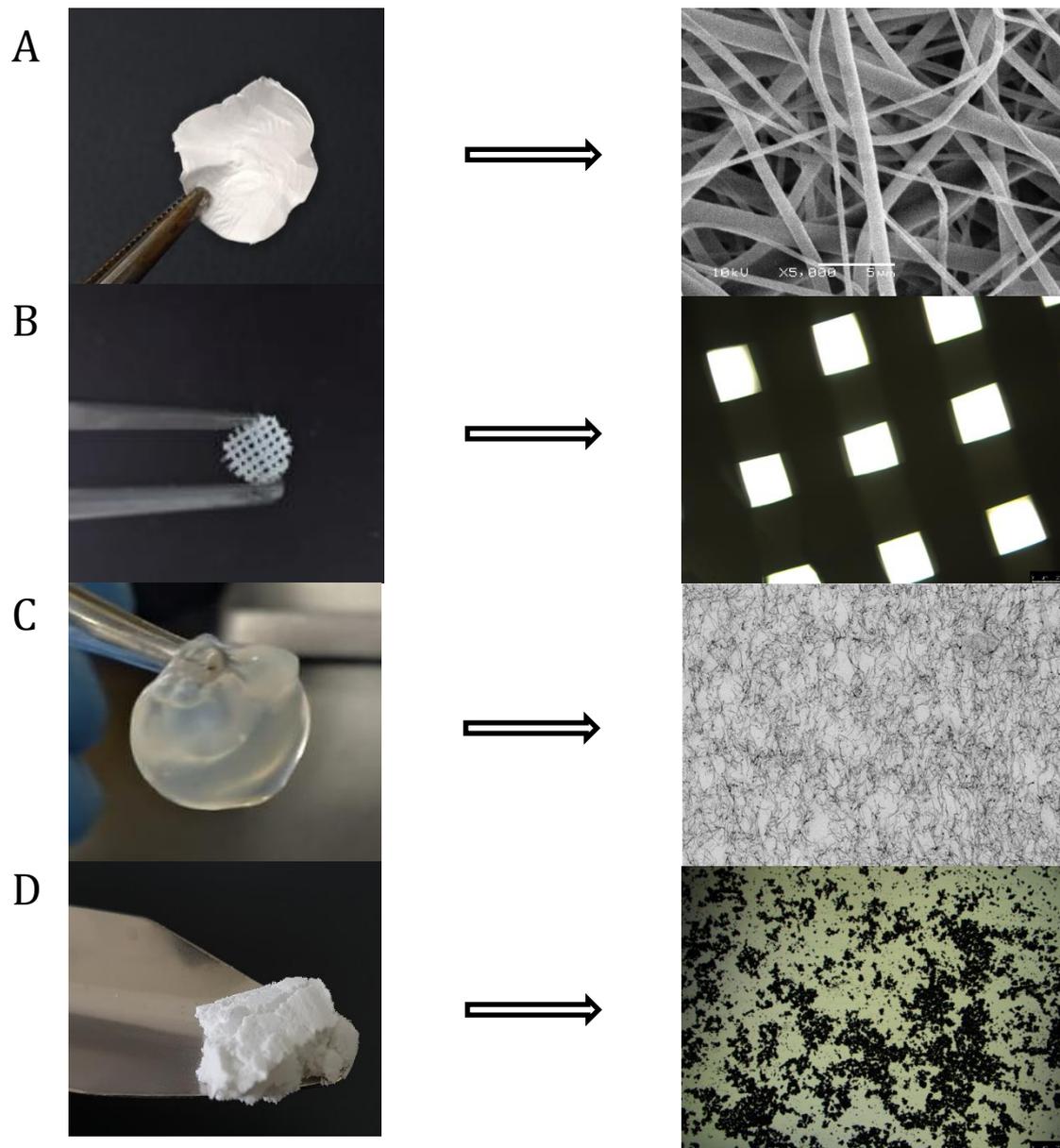


**Figura 12:** Diferenciação de células-tronco mesenquimais. Fotografias sob aumento de 100x, exceto adipogênica, na qual foi utilizado aumento de 200x. (A, B e C) Controles de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, respectivamente. (D) Diferenciação adipogênica, (E) Diferenciação condrogênica, (F) Diferenciação osteogênica (retirado de BRIÃO, 2017).

## 5.2 Caracterização dos materiais

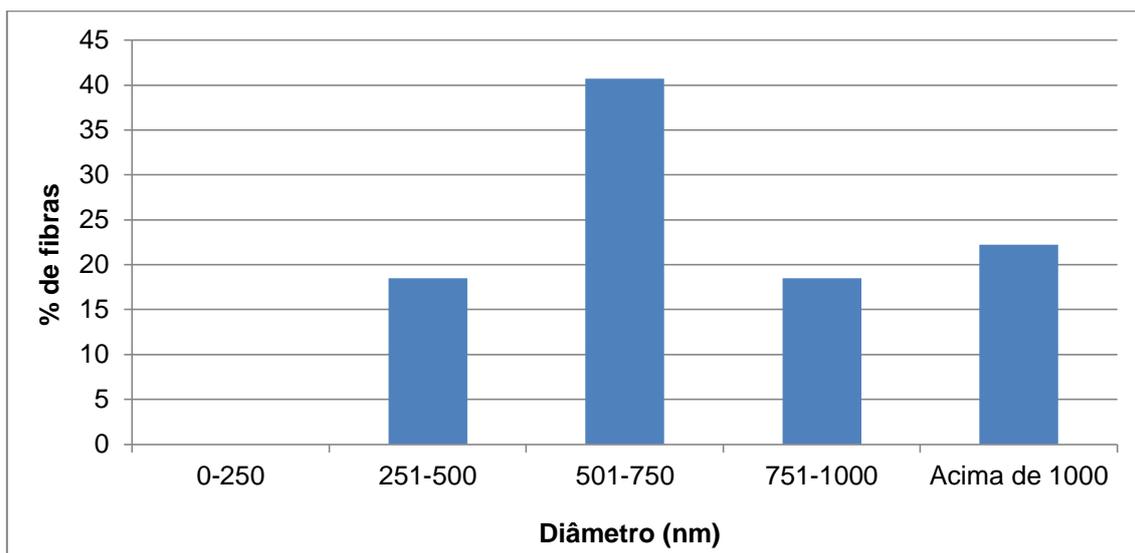
### 5.2.1 Aspectos macro e microscópico dos biomateriais avaliados

A figura 13 mostra os aspectos macro e microscópicos dos biomateriais utilizados. As estruturas fibrosas de policaprolactona obtidas por eletrofiação foram recortadas para a obtenção de 13mm de diâmetro. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou fibras bem formadas e dispostas aleatoriamente com espessuras variadas (finas e grossas) (Figura 13A). O aspecto visual dos impressos 3D de 6mm pode ser observado na figura 13B, bem como suas microfotografias em microscópio óptico, os quais possuem filamentos medindo  $504,85 \pm 22,91 \mu\text{m}$ . Os hidrogéis de alginato são mostrados na Figura 13C, na qual é possível observar a estrutura macroscópica e a imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão. O aspecto da biocerâmica em pó pode ser observado na figura 13D, assim como a aparência microscópica obtida por microscopia óptica.



**Figura 13:** Aspecto macro e microscópico dos biomateriais. (A) *Scaffolds* de PCL obtidos por eletrofição e (B) e dos filamentos dos impressos 3D. (C) Aspecto de alginato (Alg) por microscopia eletrônica de transmissão (890X), adaptado de Maurmann, 2016. (D) Aspecto da biocerâmica (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

As fibras de policaprolactona observadas demonstraram diâmetros variáveis de 315 a 2856nm, com a maioria das fibras entre 500 e 700nm e 22% de microfibras (Figura 14).

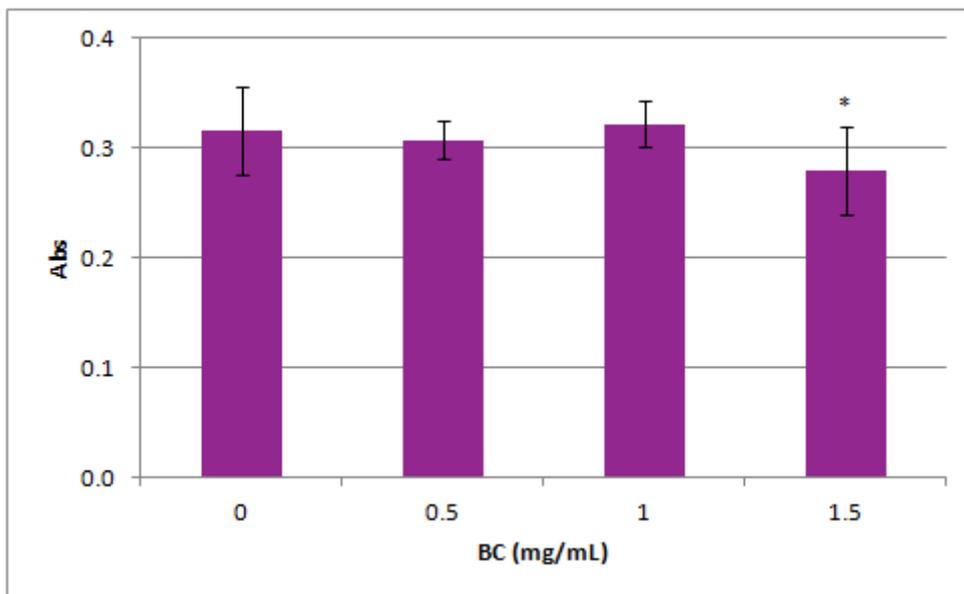


**Figura 14:** Histograma mostrando o diâmetro das nano e microfibras de PCL obtidas por eletrofiação.

### 5.3 Análises de viabilidade celular

#### 5.3.1 Biocerâmica (BC)

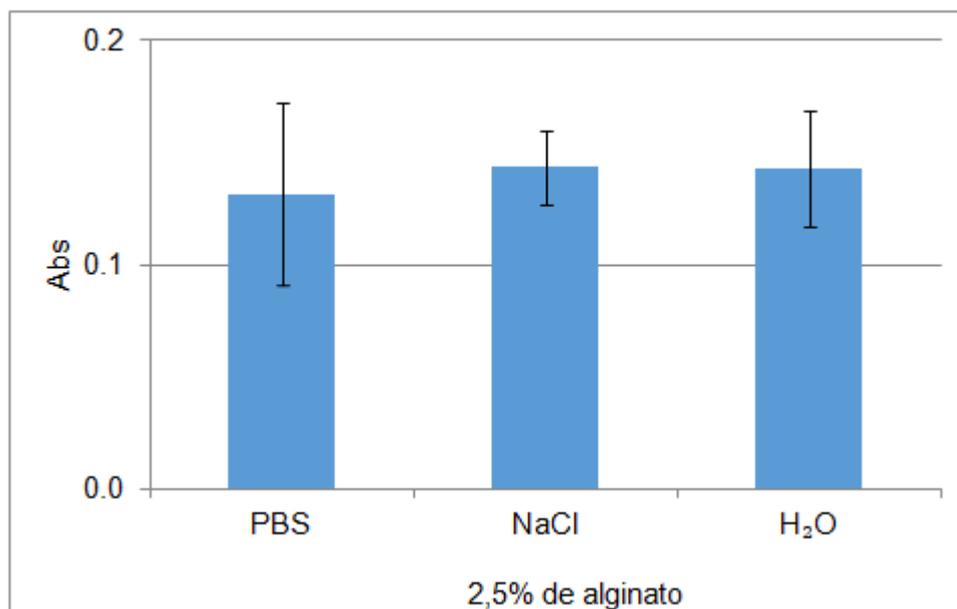
Diferentes concentrações da BC (0,5, 1 e 1,5mg/mL) foram testadas em contato direto com as células. A maior concentração de BC (1,5mg/mL) diminuiu a viabilidade das células-tronco após 2 dias de contato ( $p < 0,05$ ), já a BC nas concentrações de 0,5 e 1mg/mL manteve a viabilidade celular similar ao controle (0mg/mL) (Figura 15). A concentração de 1mg/mL foi escolhida para os demais testes pois apresentou o maior valor absoluto de absorbância, embora não tenha demonstrado aumento estatisticamente significativo na comparação com o controle. A maior concentração de BC que não diminui a viabilidade é interessante por sua tendência de induzir diferenciação.



**Figura 15:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em contato direto com a biocerâmica. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

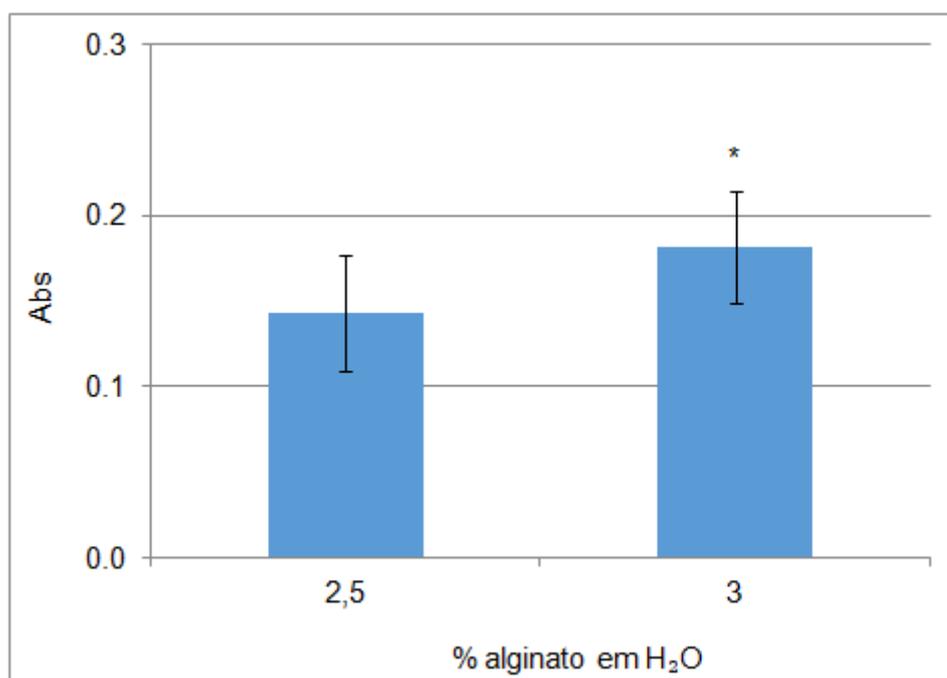
### 5.3.2 Alginato

O alginato foi utilizado na concentração de 2,5% diluído em diferentes solventes (tampão PBS, NaCl e água). Não foram observadas diferenças significativas entre os solventes testados ( $p=0,55$ ) após 6 dias de cultivo (Figura 16). Devido a facilidade, foi escolhida a água para continuação dos testes.



**Figura 16:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em hidrogéis de 2,5% de alginato com diferentes solventes. Dados expressos em média e desvio padrão.

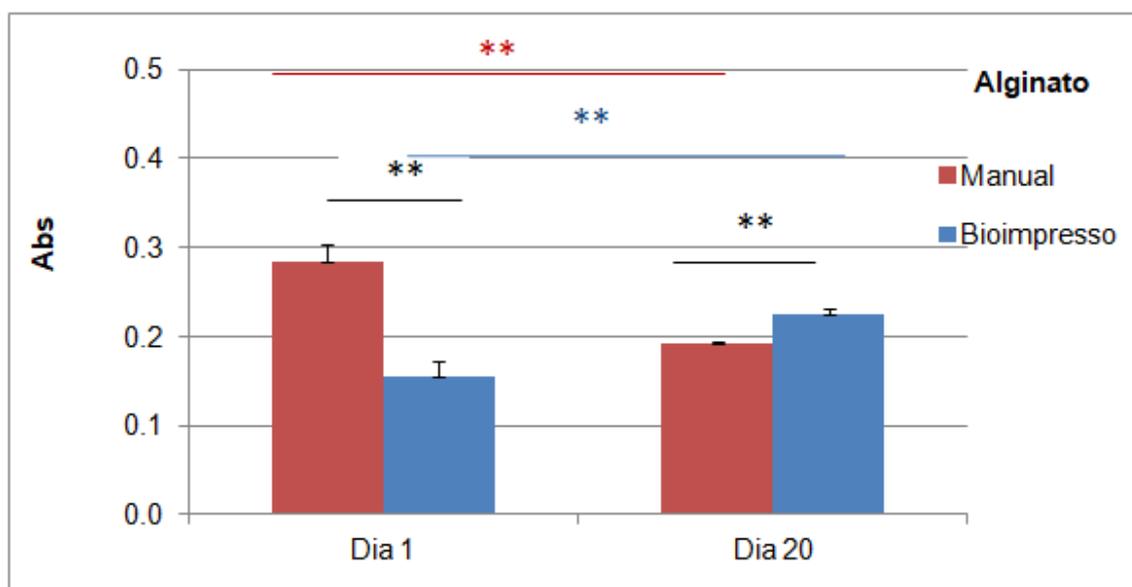
Diferentes concentrações de alginato (2,5 e 3%) diluídos em água foram comparados. A Figura 17 evidencia uma maior viabilidade nas células-tronco cultivadas quando se usou a concentração de 3% em relação à concentração de 2% de alginato, após 6 dias de cultura ( $p=0,027$ ). Devido a dificuldade de solubilização do alginato, concentrações maiores não foram testadas.



**Figura 17:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em hidrogéis de 2,5% ou 3% de alginato em água. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos (\*).

Com o objetivo de automatizar o processo, testes com a bioimpressora foram iniciados com a concentração de 3% de alginato utilizando a água como solvente. O material foi bioimpresso ou depositado manualmente com o auxílio de uma seringa (como descrito nos outros procedimentos incluindo alginato) e testado quanto à influência na viabilidade celular de queratinócitos.

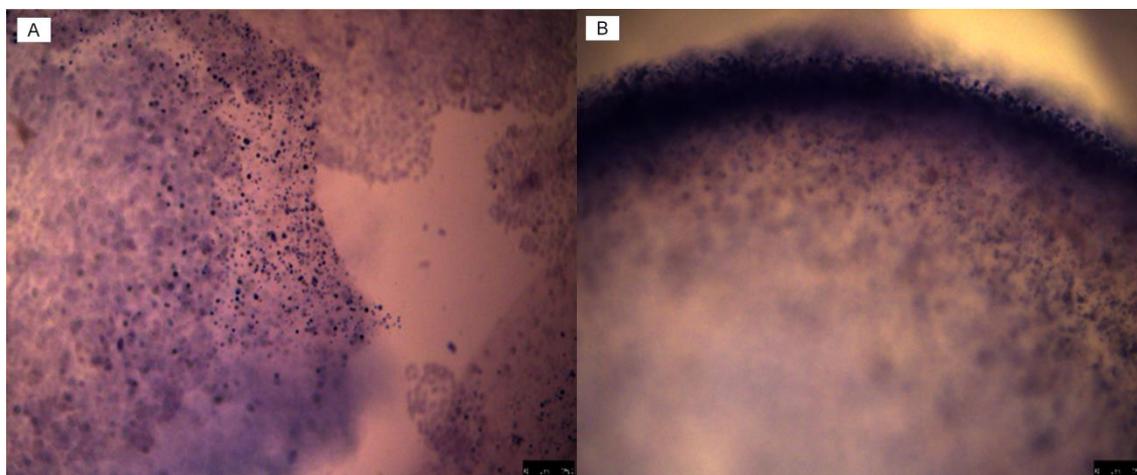
Os resultados do teste de MTT (Figura 18) demonstraram que a absorbância média e o desvio padrão após um e vinte dias foram, respectivamente,  $0,16 \pm 0,02$  e  $0,23 \pm 0,01$  ( $p=0,0071$ ) quando a bioimpressora foi utilizada, demonstrando proliferação celular, e os valores de  $0,29 \pm 0,02$  e  $0,19 \pm 0,00$  ( $p=0,0018$ ), quando houve a deposição manual do alginato, o que representa uma queda na viabilidade celular.



**Figura 18:** Resultado do cultivo de células em hidrogéis de alginato após 1 e 20 dias. Em vermelho os dados referentes ao hidrogel produzido por deposição manual e em azul a partir do processo de bioimpressão. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos (\*\*).

Os resultados apontam para uma maior viabilidade celular obtidos com a deposição manual no primeiro dia ( $p=0,0001$ ) e, em 20 dias, no hidrogel obtido por bioimpressão ( $p=0,0134$ ). Os aspectos visuais dos hidrogéis de alginato obtidos

podem ser verificados na figura 19 na qual é possível observar as características de integridade e homogeneidade mais acentuadas no produto de bioimpressão em detrimento do material obtido por deposição manual.

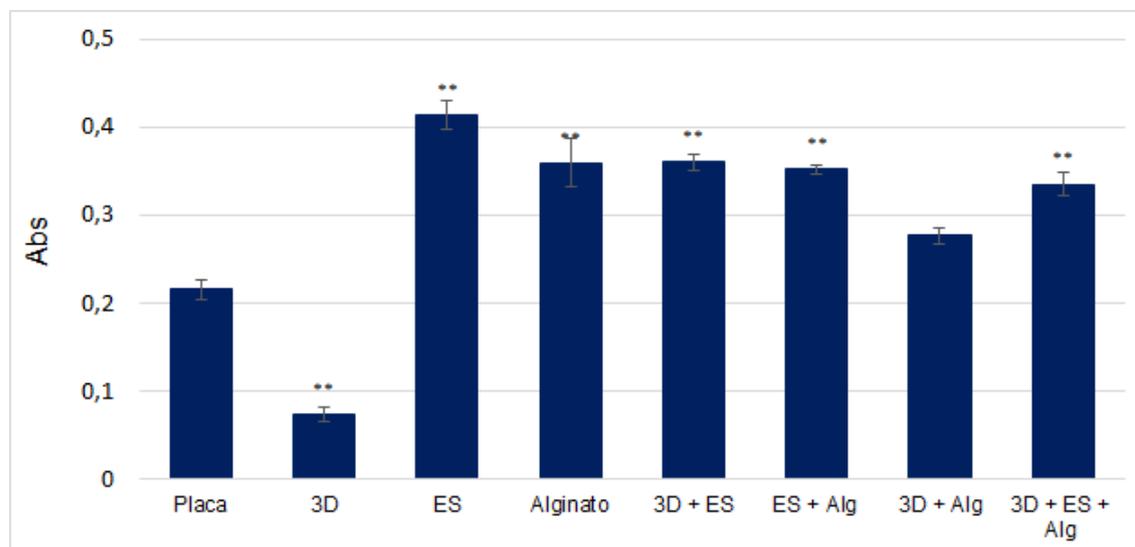


**Figura 19:** Aspecto do hidrogel de alginato produzido por (a) deposição manual e (b) bioimpressão.

### 5.3.3 Alginato e policaprolactona

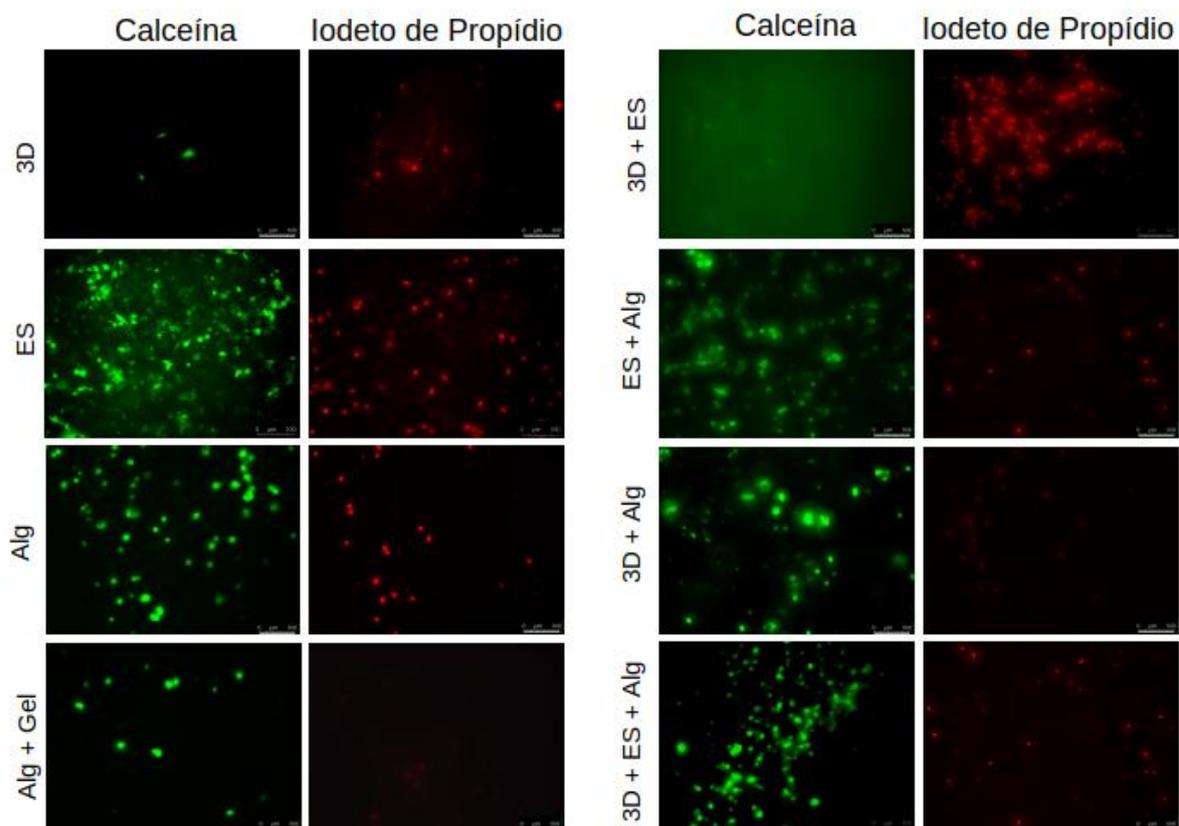
Para avaliar a funcionalidade da associação dos materiais poliméricos (alginato e policaprolactona) e desses isoladamente, 400.000 SHED por poço foram semeadas e cultivadas em cada um dos grupos testados ou diretamente no poço da placa de cultivo, durante 3 dias. A Figura 20 demonstra que quando cultivados nas estruturas 3D de policaprolactona houve uma queda brusca no total de células, verificado após o cultivo no biomaterial ( $p < 0,01$ ). Por outro lado, tanto nos hidrogéis de alginato (3%) quanto nas nanofibras de policaprolactona testados isoladamente, houve a manutenção da viabilidade celular, com resultados estatisticamente significativos ( $p < 0,01$ ). Nos grupos de associação do alginato com a policaprolactona, os grupos contendo as fibras de PCL (combinados aos hidrogéis e às estruturas 3D) demonstraram uma melhora na viabilidade celular ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao grupo do hidrogel associado à estrutura 3D, o qual não foi capaz de manter a viabilidade celular adequada ( $p > 0,05$ ). Por fim, a associação de alginato e policaprolactona em suas duas formas combinadas (nanofibras e 3D) manteve a viabilidade celular, mostrando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ), quando comparado com os demais grupos demonstrando a

funcionalidade da associação dos polímeros escolhidos para a formação do *scaffold*.



**Figura 20:** Resultado do ensaio de MTT do cultivo de células-tronco mesenquimais em impressos tridimensionais de policaprolactona (3D), fibras de policaprolactona obtidas por eletrofiliação (ES), hidrogéis de alginato (Alg) isoladamente ou em associação. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados com  $p < 0,01$  foram considerados estatisticamente significativos (\*\*).

Além da avaliação quantitativa por MTT, a viabilidade foi demonstrada qualitativamente após marcação das células-tronco vivas, com calceína (verde) e mortas, com iodeto de propídio (vermelho). Na figura 21 é possível observar as microfotografias obtidas.



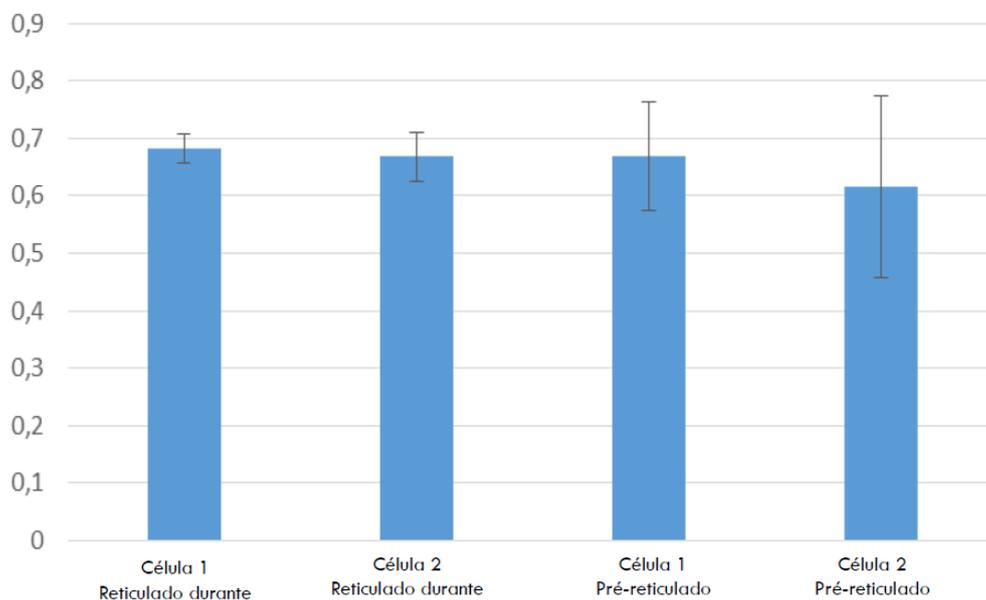
**Figura 21:** Avaliação qualitativa da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais cultivadas em estruturas tridimensionais de PCL (3D), fibras obtidas por eletrofição (ES), hidrogéis de alginato (Alg) e suas combinações.

#### 5.3.4 Otimização do processo de obtenção do *scaffold* final

Na busca de uma metodologia mais consistente, após a definição das concentrações poliméricas utilizadas para a produção dos diferentes biomateriais, foi realizado um teste para avaliar a influência do  $\text{CaCl}_2$  na viabilidade das células cultivadas. Devido a exposição das células ao  $\text{CaCl}_2$  durante o processo de reticulação, avaliou-se a possibilidade do excesso de cálcio estar sendo citotóxico e ocasionando uma diminuição na viabilidade celular, mesmo antes do experimento iniciar propriamente, ainda que em todos os casos há duas lavagens para assegurar a remoção do cálcio residual. Sendo assim, utilizando os *scaffolds* finais, foi considerado conduzir o mesmo ensaio com diferentes tipos celulares para verificar a funcionalidade do sistema proposto. Desse modo, foram testadas duas diferentes linhagens de células obtidas a partir do cultivo primário, como explicado previamente. Ambas linhagens foram utilizadas na densidade de 1.000.000 células

por poço e o processo de reticulação do hidrogel foi realizado antes e durante o procedimento de semeadura.

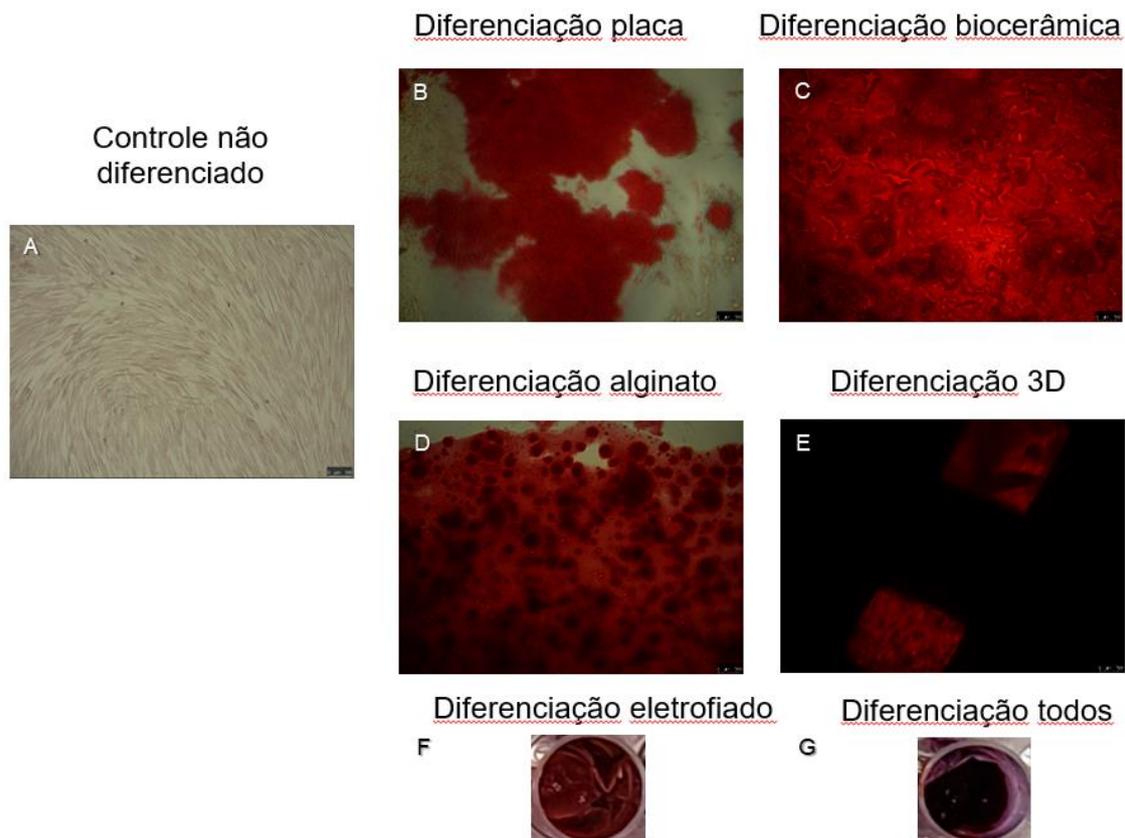
Como mostra a Figura 22, após 4 dias de cultivo, utilizando duas linhagens distintas e testando as diferentes situações de reticulação, não foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos testados ( $p > 0,05$ ), descartando-se a hipótese de toxicidade cogitada.



**Figura 22:** Resultado do cultivo de células-tronco mesenquimais em *scaffolds* compostos por hidrogel de alginato, nanofibras de policaprolactona, impressos tridimensionais de policaprolactona e biocerâmica para avaliação do momento de reticulação em duas linhagens celulares. Dados expressos em média e desvio padrão. Resultados não estatisticamente significativos.

### 5.3.5 Diferenciação osteogênica das células-tronco nos biomateriais

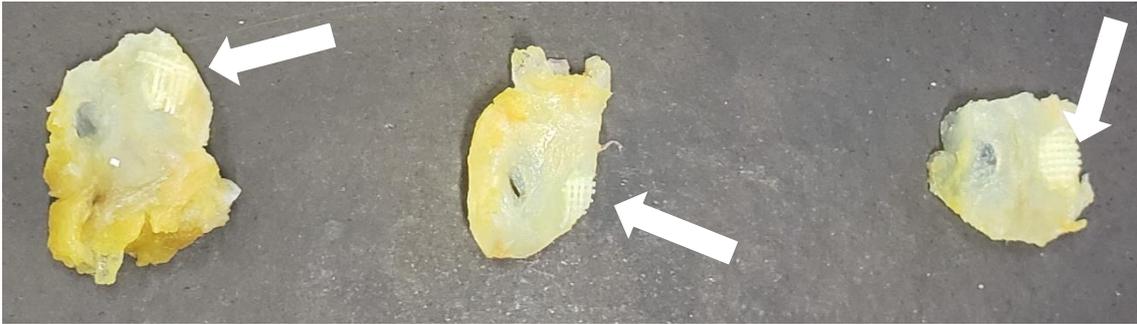
A Figura 23 mostra a coloração com Alizarina vermelha após diferenciação das células-tronco em controle não diferenciado (A), diferenciação na placa (B), biocerâmica (C), alginato (D) e impressos 3D (E) por meio de microscopia. Devido a falta de transparência, não foram obtidas microfotografias e sim fotos dos poços nos materiais eletrofiados (F) e combinação de todos esses materiais (G).



**Figura 23:** Diferenciação osteogênica de SHED. Controle não diferenciado (A), diferenciação na placa de cultura (B), com 1mg/ml de BC (C), em alginato (D), em matrizes de PCL impressa tridimensionalmente (E), em PCL eletrofiado (F) e em todos (G).

#### 5.4 Estudo piloto *in vivo*

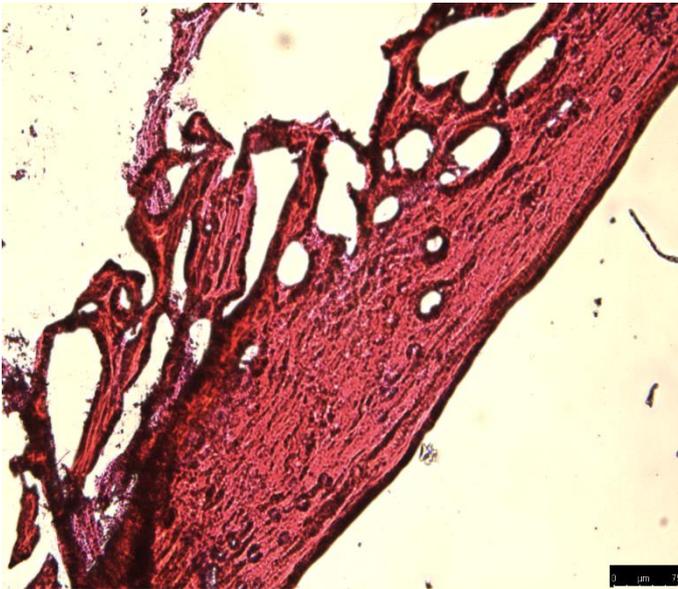
Os testes iniciais com modelo animal foram realizados após 45 dias para comparação de defeitos críticos sem materiais e feridas com os *scaffolds* (ES + 3D + Alg + BC). Os resultados demonstraram que as feridas sem biomateriais apresentam tecido delgado e é possível observar a presença dos impressos 3D (Figura 24).



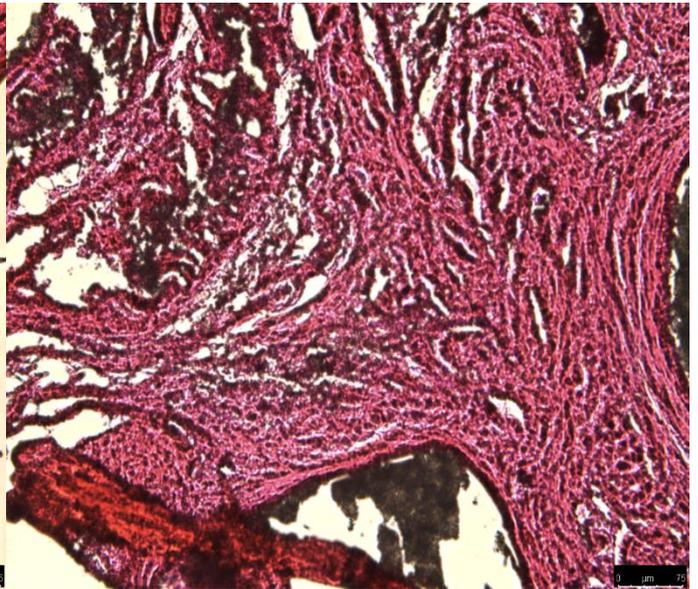
**Figura 24:** Aspecto de três calotas cranianas após fixação e descalcificação. No lado esquerdo de cada calota o grupo controle e os biomateriais no lado direito (setas).

A análise histológica por HE (Figura 25) indicou o que aparenta ser a presença de um princípio de tecido cartilaginoso no grupo controle (A), o que confirma que o defeito ósseo foi de tamanho crítico, visto que não houve a recuperação espontânea do tecido no final do período avaliado. No grupo que continha o *scaffold* (B), foi possível observar o que parecem ser estruturas granulares pretas, podendo indicar o processo de mineralização do tecido ósseo.

A



B



**Figura 25:** Histologia do tecido ósseo corado por hematoxilina e eosina (HE). Grupo controle (A) e grupo contendo *scaffolds* (B). Aumento de 10 ou 20x.

## 6. DISCUSSÃO

A engenharia tecidual é uma ciência multidisciplinar com o potencial de causar grandes impactos tanto no meio científico e acadêmico, quanto para a sociedade em geral. O avanço das pesquisas nessa nova área e a crescente aplicação dos produtos gerados em testes pré-clínicos e clínicos, demonstra a possibilidade de promover estudos cada vez mais complexos e a capacidade gerar vastos progressos tecnológicos. Além disso, a disponibilização das tecnologias desenvolvidas para a sociedade é capaz de otimizar a forma com que os pacientes são tratados atualmente, trazendo mais funcionalidade aos tratamentos e qualidade de vida aos que necessitam dele. Também é importante levar em conta a geração de receita financeira que o desenvolvimento científico ocasiona para o país.

O presente trabalho confirma a hipótese de unir biomateriais de diferentes classes no intuito de construir uma estrutura tridimensional semelhante à matriz extracelular do tecido ósseo nativo capaz de servir como *scaffold* para células-tronco mesenquimais. A estrutura obtida pode ser utilizada como sistema de cultivo 3D *in vitro* para o estudo de morfogênese, expressão gênica e diferenciação celular, bem como no teste de drogas, sistemas de liberação controlada e na produção de proteínas recombinantes (MCKEE; CHAUDHRY, 2017). Além disso, o emprego desses *scaffolds* em investigações *in vivo* em modelos animais e testes pré-clínicos poderia significar uma alternativa aos tratamentos atuais para lesões no tecido ósseo (SCHMIDT *et al.*, 2019).

A associação dos biomateriais serviu à premissa de promover um ambiente tridimensional no qual as SHED pudessem se manter viáveis. A formação do hidrogel utilizando o alginato, as propriedades de osteoindução e integração à matriz nativa da biocerâmica e a rigidez promovida pela policaprolactona proporcionaram a obtenção de uma estrutura possivelmente substituta do tecido ósseo nativo.

Considerando as características únicas dos diferentes materiais empregados e os benefícios encontrados em seu uso combinado, é possível afirmar que cada componente cumpriu com sua função pré determinada para mimetizar funcionalmente a matriz natural. Paralelamente, a literatura reporta a associação de *scaffolds* de policaprolactona e gelatina com nanohidroxiapatita e vitamina D

visando a obtenção de um suporte para a engenharia tecidual óssea. Nesse estudo, foi possível observar a melhora na viabilidade celular com a adição de cada componente e com a maior porcentagem de sobrevivência quando utilizando a combinação completa, a partir de ensaios com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (SATTARY *et al.*, 2019).

Todas as linhagens de células-tronco mesenquimais foram obtidas a partir de cultivo primário foram extraídas de dentes decíduos esfoliados, as chamadas SHED, e foram caracterizadas por citometria de fluxo e ensaio de diferenciação celular. Utilizou-se os requisitos estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular e Gênica (*International Society for Cell and Gene Therapy* - ISCT) como guia para a confirmação do caráter tronco das células isoladas e cultivadas. Foi possível afirmar a presença de marcadores de células-tronco e a ausência de marcadores hematopoéticos no ensaio de imunofenotipagem por citometria de fluxo. Durante todo o período de cultivo, as células-tronco mantiveram a aderência ao plástico de cultivo e sua morfologia fibroblastóide. Paralelamente, os ensaios de diferenciação celular demonstraram a capacidade das células em se diferenciar em condroblastos, osteoblastos e adipócitos, sob estímulo de diferenciação por fatores adicionados ao meio de cultivo (BERNARDI *et al.*, 2011).

Sabe-se que as células-tronco, além de colonizar, proliferar e se diferenciar quando aderidas ao um substrato, são também capazes de secretar moléculas sinalizadoras, ou fatores bioativos, que participam ativamente da regeneração do tecido de interesse. Também é importante ressaltar que as células do próprio paciente podem ser recrutadas para o sítio da lesão a partir de um processo denominado *homing*, ou recrutamento, atuando assim na reparação tecidual (KOSE *et al.*, 2018). Sendo assim, seria interessante avaliar o potencial de recrutamento das células-tronco semeadas nos biomateriais obtidos.

O uso do alginato como polímero para a obtenção de hidrogéis tridimensionais é amplamente difundido na literatura científica (DODERO *et al.*, 2019; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2019). Anteriormente ao presente estudo, a produção do hidrogel de alginato já havia sido padronizada em nosso laboratório.

Todavia, o alginato não possui sítios de reconhecimento nos quais as células podem se ligar. Sendo assim, é interessante a adição de outros fatores, como o

colágeno e a gelatina que, por sua vez, possuem esses sítios conhecidos como RGD, para a aderência celular (LEE *et al.*, 2016). Dada a situação, testes com colágeno e gelatina foram realizados no intuito de prover esses sítios para que as células pudessem ser aderidas nos hidrogéis de alginato, sendo cultivadas em diferentes níveis no espaço tridimensional. A adição de colágeno hidrolisado foi capaz de melhorar a viabilidade celular (BRIÃO, 2017). Todavia, o material utilizado não apresentava pureza satisfatória. Dessa forma, tentou-se substituí-lo por gelatina de alta pureza, a qual não foi capaz de replicar os resultados do colágeno, sendo então considerada pouco efetiva para o fim desejado.

Também foi testada a influência do momento de reticulação na viabilidade celular. Foi sugerida a hipótese do processo de reticulação do hidrogel de alginato estar interferindo negativamente na viabilidade das células, uma vez que a exposição das células ao  $\text{CaCl}_2$  (agente reticulante) poderia ocasionar morte celular pela toxicidade das concentrações de cálcio. Todavia, os resultados demonstraram a ausência de diferença na viabilidade celular em duas linhagens celulares submetidas ou não ao processo de reticulação do hidrogel, o que corrobora com os resultados encontrados durante a padronização, quando houve a definição da concentração de 50mM de  $\text{CaCl}_2$  para o referido fim (ALBRECHT, 2017).

As biocerâmicas têm sido empregadas na engenharia tecidual das mais diversas formas, desde *scaffolds* obtidos por impressão 3D para reconstrução óssea após terapia tumoral (MA *et al.*, 2018) a filmes depositados por aerossol para fins odontológicos (CHO *et al.*, 2019) e sinterização para defeitos osteocondrais (BUNPETCH *et al.*, 2018).

No presente estudo, a biocerâmica foi adicionada aos hidrogéis de alginato no intuito de agirem como fatores bioativos a partir da utilização da hidroxiapatita e os íons que são liberados em seu processo de degradação (DU *et al.*, 2019). Os resultados apontaram para uma diminuição da viabilidade celular em um primeiro momento, porém após 5 dias houve uma tendência de recuperação e proliferação celular.

Em estudos futuros, objetiva-se promover testes por períodos mais longos para a avaliação da influência da biocerâmica, como no estudo com alginato, gelatina e nanohidroxiapatita, no qual foi avaliada a viabilidade celular em 7, 14, 21

e 28 dias. Nesses estudos, pôde-se observar que as concentrações de 1 e 5% de nanohidroxiapatita foram benéficas ao crescimento celular em até 30 vezes, durante os maiores tempos de exposição (NABAVINIA *et al.*, 2019).

A policaprolactona foi explorada quanto a duas formas de produção de estruturas: as nanofibras, obtidas por eletrofiação, e os impressos 3D obtidos por manufatura aditiva. Dada a necessidade de prover um suporte no qual as células pudessem aderir para posteriormente migrar e preencher os espaços remanescentes do *scaffold* construído, redes de nanofibras foram empregadas. Os resultados dos testes demonstraram uma grande capacidade das nanofibras na manutenção da viabilidade celular quando utilizadas separadamente. As associações com o restante dos materiais demonstraram a boa funcionalidade dessas combinações para a cultura celular. Em comparação, um estudo demonstrou que a adição de fibroína de seda a nanoestruturas de PCL foi capaz de aumentar em cerca de 4 vezes a viabilidade das células cultivadas (NAZEER *et al.*, 2019).

Houve a proposição do uso de vitamina D (um importante regulador do metabolismo de minerais) em associação com as nanofibras, para que essas liberassem o composto enquanto o tecido fosse sendo construído. Testes preliminares foram realizados utilizando-se a tecnologia de eletrofiação, na qual a vitamina foi adicionada à solução de policaprolactona padronizada. Um estudo previamente reportado apontou para a manutenção da liberação de vitamina D (dose inicial 10mg/g) em *scaffolds* de PCL, com a finalidade de promover a produção de peptídeos antimicrobianos (JIANG *et al.*, 2015). Paralelamente, nossos resultados preliminares apontaram para uma tendência na melhora da viabilidade celular mediante cultivo nas nanofibras contendo 2% de vitamina D (dados não mostrados), porém mais testes seriam necessários para avaliar o efeito de diferentes concentrações.

A utilização das estruturas tridimensionais obtidas por impressão 3D objetivou conferir resistência mecânica aos constructos, no intuito de, posteriormente, durante a regeneração *in vivo* suprir as necessidades de força e tração que o tecido naturalmente suporta. Os impressos 3D utilizados no presente trabalho têm força mecânica reportada como  $28,2 \pm 3,5$ MPa (CUNHA *et al.*, 2019),

o que se encaixa nos valores encontrados para ossos trabeculares humanos, que variam entre 2–80MPa (LI *et al.*, 2015).

Adicionalmente, é possível modular os parâmetros mecânicos dependendo da conformação da estrutura. Foi avaliada a influência do distanciamento das estruturas impressas de policaprolactona na força mecânica do constructo. Sem a variação de espaçamento, a média do módulo tênsil passou de  $8,22 \pm 1,0$  para  $18,02 \pm 3,1$ MPa quando o diâmetro dos filamentos variou de 700 para  $1300\mu\text{m}$ . Já, quando o diâmetro foi mantido e alterou-se a distância de 2.000 para  $1.300\mu\text{m}$  foi possível observar um aumento de  $9,92 \pm 1,8$  para  $18,02 \pm 3,1$ MPa no módulo tênsil (CHRISTIANI *et al.*, 2019).

Ainda que o objetivo não fosse para o cultivo *in vitro*, era necessário verificar se as estruturas eram capazes de manter a viabilidade das células cultivadas. Os resultados da utilização do impresso 3D isoladamente mostraram baixa capacidade de cultivo. Uma hipótese para explicação do ocorrido discute sobre a influência da própria conformação da estrutura, que contém poros de  $500\mu\text{m}$ , o que é substancialmente maior do que o tamanho normal celular, que gira em torno de  $20\mu\text{m}$ . Com o tamanho de poro cerca de 25 vezes maior que as células, é visível no teste MTT que a maioria das células fica depositada diretamente no poço de cultivo e apenas um número menor se adere ao impresso. Um estudo demonstrou que a utilização de membranas 3D de policaprolactona com poros de  $130\mu\text{m}$  foi mais capaz de promover a regeneração da calvária de coelhos, quando comparado com membranas com poros de 300 e  $700\mu\text{m}$  (SHIM *et al.*, 2017), o que corrobora com a hipótese acima.

Já com a associação com o alginato e as nanofibras, a viabilidade encontrada foi superior, o que demonstra a possibilidade de utilização do sistema como um todo. A baixa capacidade das estruturas de PCL em manter a viabilidade celular e o incremento ocasionado pela adição de outros componentes na formação do *scaffold* já foram reportados na literatura. Com a adição de hidroxiapatita e polidopamina a suportes de PCL impressos, foi possível duplicar a capacidade de manutenção da viabilidade de células-tronco mesenquimais humanas (NOWICKI *et al.*, 2019). Em outro estudo, as fibras de PCL foram cobertas com micropartículas de Bio-Oss, o que aumentou significativamente a viabilidade dos 3 tipos celulares utilizados (HOSSEINI *et al.*, 2019).

A associação do hidrogel de alginato, contendo a biocerâmica, com as nanofibras e estruturas 3D foi capaz de incrementar a viabilidade celular de células-tronco mesenquimais. Também foi promovido testes de diferenciação osteogênica das SHED nos *scaffolds*, para verificar se os componentes por si auxiliariam as células no processo de diferenciação, o que pode acelerar a regeneração *in vivo*. Os resultados apontaram para a capacidade das SHED em se diferenciar na linhagem osteogênica em todas as estruturas testadas, o que demonstra que o biomaterial obtido é capaz de promover a diferenciação celular osteogênica.

No contexto de testes *in vitro*, essas análises foram reportadas em um trabalho utilizando impressos 3D associados a nanofibras de PLGA, no qual células-tronco mesenquimais do cordão umbilical tiveram sua capacidade de diferenciação avaliada a partir das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), fosfatase alcalina e histologia. Os resultados apontaram para a expressão de osteopontina e osteocalcina, dois importantes marcadores osteogênicos, nas células semeadas, além de atividade confirmada de fosfatase alcalina e a observação de depósitos de cálcio nas imagens histológicas (MAURMANN *et al.*, 2017).

A degradação dos *scaffolds* poderia também ser estudada para que se tivesse certeza do tempo necessário para a decomposição deles no sítio lesado à medida que o tecido novo seria formado, levando em conta que idealmente os biomateriais devem permanecer no local apenas até que a regeneração ocorresse.

A degradação por hidrólise da policaprolactona dura cerca de 2 a 3 anos (SUN *et al.*, 2006). Foi reportado que com a presença de SHED no ambiente *in vivo*, em 16 semanas, estruturas tridimensionais de policaprolactona foram degradadas em cerca de 65%, o que parece interessante dado a média de tempo de cerca de seis meses necessária para a regeneração óssea natural e a função da estrutura na manutenção do suporte estrutural durante o reparo tecidual (LAM *et al.*, 2019). Em outro estudo, nanofibras de policaprolactona tiveram sua degradação avaliada durante 3 meses. Nesse período, apenas 10% do material foi degradado, ocorrendo a maior parte no segundo mês (SHI *et al.*, 2014).

Já os hidrogéis de alginato demonstraram uma perda de massa de cerca de 40% em 72h, enquanto com a adição de biocerâmica a esse material a porcentagem de degradação subiu para cerca de 85%, uma vez que as interações iônicas

proporcionadas pelos íons  $\text{Ca}^{2+}$  liberados pelo biomaterial aceleraram o processo de degradação (MORAIS *et al.*, 2013).

Por fim, novos testes de regeneração *in vivo* poderão futuramente ser realizados para avaliar a capacidade dos *scaffolds* propostos em restabelecer as características morfológicas e funcionais do tecido nativo. Até o presente momento não é possível encontrar na literatura um relato da utilização da combinação dos mesmos materiais do presente trabalho. Ainda assim, é possível comparar com outros estudos, como o reportado uso de *scaffolds* de PCL incorporados com hidroxiapatita deficiente de cálcio em ratos *Wistar*, sendo avaliados 32 dias após a cirurgia. Os resultados apontaram para uma melhora de 31% na formação óssea em relação a regeneração natural e 17% quando comparado com *scaffolds* compostos apenas por PCL (CARDOSO *et al.*, 2019).

Dados os resultados do presente trabalho, é possível afirmar que a associação do hidrogel de alginato com as estruturas de policaprolactona e a biocerâmica foi capaz de promover a viabilidade celular, sendo assim relevante no contexto da engenharia tecidual na medicina regenerativa.

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo desenvolvido no Laboratório de Hematologia e Células-tronco da UFRGS culminou na produção de uma estrutura visando auxiliar na regeneração óssea, capaz de manter a viabilidade de células-tronco mesenquimais. Objetivando a mimetização do tecido ósseo, nossos resultados demonstraram a viabilidade da utilização de *scaffolds* compostos a partir da combinação de dois diferentes biomateriais poliméricos, sendo um natural, alginato, e um sintético, a policaprolactona, e uma biocerâmica.

O *scaffold* obtido foi construído a partir da associação de um hidrogel de alginato, uma biocerâmica, bem como uma estrutura tridimensional e uma rede nanoestruturada de policaprolactona. Cada componente teve sua influência na viabilidade de células-tronco mesenquimais avaliada de forma isolada, seguida por testes de combinação dos materiais e, finalmente, da funcionalidade do sistema como um todo *in vitro* e um teste piloto *in vivo*.

As células foram isoladas e caracterizadas utilizando guias internacionais como parâmetros de avaliação. Durante os testes de influência dos *scaffolds* na viabilidade celular, as células permaneceram viáveis durante todo o tempo de cultivo. Ao fim dos experimentos, foi possível constatar que a associação de todos os biomateriais escolhidos para a formação da estrutura foi benéfica para a viabilidade celular, podendo assim ser utilizada na engenharia tecidual óssea com vistas ao emprego na medicina regenerativa.

## 8. PERSPECTIVAS

Os *scaffolds* obtidos servem como ponto de partida no que se refere a engenharia tecidual óssea utilizando biomateriais de diversas classes simultaneamente, uma vez que podem ser empregados como suporte para avaliações mais aprofundadas no tema.

As perspectivas futuras incluem:

- Avaliar outros materiais como possíveis substitutos do hidrogel de alginato.
- Caracterizar física e quimicamente os *scaffolds* obtidos.
- Promover o cultivo de células-tronco diferenciadas em osteoblastos nos *scaffolds*.
- Investigar a influência dos biomateriais sobre as células em um maior período de tempo.
- Analisar os perfis de degradação das estruturas para averiguar se são compatíveis com os tempos de regeneração humanos.
- Verificar o potencial de regeneração óssea *in vivo* em um maior número de animais.

## REFERÊNCIAS

Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., & Li, C. (2013). Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: A review. **Reviews on Advanced Materials Science**, 34(2), 123–140. Acesso em: 4 dez. 2019.

Albrecht, C. Avaliação in vitro do comportamento de células-tronco mesenquimais em scaffolds contendo diferentes concentrações de alginato e cloreto de cálcio como estratégia em medicina regenerativa. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Biomedicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017. Acesso em: 3 dez. 2019.

Almela T, Brook I, Khoshroo K, Rasoulianboroujeni M, Fahimipour F, Tahiri M, Dashtimoghadam E, El-Awa A, Tayebi L and Moharamzadeh K. 2017 Simulation of corticocancellous bone structure by 3D printing of bilayer calcium phosphate-based scaffolds **Bioprinting** 6 1–7. Acesso em: 4 dez. 2019.

Azeena, S., Subhapradha, N., Selvamurugan, N., Narayan, S., Srinivasan, N., Murugesan, R., ... Moorthi, A. (2017). Antibacterial activity of agricultural waste derived wollastonite doped with copper for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**, 71, 1156–1165. doi:10.1016/j.msec.2016.11.118. Acesso em: 4 dez. 2019.

Barros, J., Ferraz, M. P., Azeredo, J., Fernandes, M. H., Gomes, P. S., & Monteiro, F. J. (2019). *Alginate-nanohydroxyapatite hydrogel system: Optimizing the formulation for enhanced bone regeneration*. **Materials Science and Engineering: C**, 109985. doi:10.1016/j.msec.2019.109985. Acesso em: 3 dez. 2019.

Bernardi, L. et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 7, p. 973–9, jul. 2011. Acesso em: 1 dez. 2019.

Brião, M. Cultivo de células-tronco mesenquimais em *scaffolds* de alginato associado a colágeno para aplicação na engenharia tecidual Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, 2017. Acesso em: 4 dez. 2019.

Buckwalter, J.A.; Brown, T.D. Joint injury, repair, and remodeling: Roles in post-traumatic osteoarthritis. **Clin. Orthop. Relat. Res.** 2004, 423, 7–16. 8. Acesso em: 4 dez. 2019.

Bunpetch, V., Zhang, X., Li, T., Lin, J., Maswikiti, E. P., Wu, Y., ... Ouyang, H. (2018). Silicate-based bioceramic scaffolds for dual-lineage regeneration of osteochondral defect. **Biomaterials**. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.11.025. Acesso em: 5 dez. 2019.

Buyuksungur, S., Endogan Tanir, T., Buyuksungur, A., Bektas, E. I., Torun Kose, G., Yucel, D., ... Hasirci, N. (2017). 3D printed poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds modified with hydroxyapatite and poly(propylene fumarate) and their effects on the healing of rabbit femur defects. **Biomaterials Science**, 5(10), 2144–2158. doi:10.1039/c7bm00514h. Acesso em: 4 dez. 2019.

Cardoso, G. B. C., Tondon, A., Maia, L. R. B., Cunha, M. R., Zavaglia, C. A. C., & Kaunas, R. R. (2019). *In vivo approach of calcium deficient hydroxyapatite filler as bone induction factor*. **Materials Science and Engineering: C**, 99, 999–1006. doi:10.1016/j.msec.2019.02.060. Acesso em: 4 dez. 2019.

Chimene, D., Kaunas, R., & Gaharwar, A. K. (2019). *Hydrogel Bioink Reinforcement for Additive Manufacturing: A Focused Review of Emerging Strategies*. **Advanced Materials**, 1902026. doi:10.1002/adma.201902026. Acesso em: 6 dez. 2019.

Cho, M.-Y., Lee, D.-W., Kim, I.-S., Kim, W.-J., Koo, S.-M., Lee, D., ... Oh, J.-M. (2018). *Evaluation of structural and mechanical properties of aerosol-deposited bioceramic films for orthodontic brackets*. **Ceramics International**. doi:10.1016/j.ceramint.2018.12.159. Acesso em: 8 dez. 2019.

Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., & Castellano, M. (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: an experimental design approach to predict the crosslinking degree. **European Polymer Journal**. doi:10.1016/j.eurpolymj.2019.06.028. Acesso em: 5 dez. 2019.

Du, X., Wei, D., Huang, L., Zhu, M., Zhang, Y., & Zhu, Y. (2019). *3D printing of mesoporous bioactive glass/silk fibroin composite scaffolds for bone tissue*

*engineering. Materials Science and Engineering: C.* doi:10.1016/j.msec.2019.05.016. Acesso em: 4 dez. 2019.

El-Fiqi, A., Kim, J.-H., & Kim, H.-W. (2015). Osteoinductive Fibrous Scaffolds of Biopolymer/Mesoporous Bioactive Glass Nanocarriers with Excellent Bioactivity and Long-Term Delivery of Osteogenic Drug. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 7(2), 1140–1152. doi:10.1021/am5077759. Acesso em: 2 dez. 2019.

Fu, S., Du, X., Zhu, M., Tian, Z., Wei, D., & Zhu, Y. (2019). 3D printing of layered mesoporous bioactive glass/sodium alginate-sodium alginate scaffolds with controllable dual-drug release behaviors. **Biomedical Materials**. doi:10.1088/1748-605x/ab4166. Acesso em: 4 dez. 2019.

Ghosh, Moumita et al. “Injectable Alginate-Peptide Composite Hydrogel as a Scaffold for Bone Tissue Regeneration.” **Nanomaterials (Basel, Switzerland)** vol. 9,4 497. 1 Apr. 2019, doi:10.3390/nano9040497. Acesso em: 4 dez. 2019.

Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. **Injury**, 36(3), S20–S27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029. Acesso em: 1 dez. 2019.

Goonoo, N., Bhaw-Luximon, A., Bowlin, G. L., & Jhurry, D. (2013). An assessment of biopolymer- and synthetic polymer-based scaffolds for bone and vascular tissue engineering. **Polymer International**, 62(4), 523–533. doi:10.1002/pi.4474. Acesso em: 4 dez. 2019.

Hench, L. L. (1991). Bioceramics: From Concept to Clinic. **Journal of the American Ceramic Society**, 74(7), 1487–1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x. Acesso em: 2 dez. 2019.

Hernández-González, A. C., Téllez-Jurado, L., & Rodríguez-Lorenzo, L. M. (2019). Alginate hydrogels for bone tissue engineering, from injectables to bioprinting: A Review. **Carbohydrate Polymers**, 115514. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115514. Acesso em: 4 dez. 2019.

Hosseini, F. S., Soleimanifar, F., Ardeshirylajimi, A., Vakilian, S., Mossahebi-Mohammadi, M., Enderami, S. E., ... Zare Karizi, S. (2019). *In vitro osteogenic differentiation of stem cells with different sources on composite scaffold containing*

*natural bioceramic and polycaprolactone*. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 47(1), 300–307. doi:10.1080/21691401.2018.1553785. Acesso em: 5 dez. 2019.

Jiang, Jiang et al. “Local Sustained Delivery of 25-Hydroxyvitamin D3 for Production of Antimicrobial Peptides.” **Pharmaceutical research** vol. 32,9 (2015): 2851-62. doi:10.1007/s11095-015-1667-5. Acesso em: 4 dez. 2019.

Jugdaohsingh R1. Silicon and bone health. **Journal of Nutrition Health Aging**. 2007 Mar-Apr;11(2):99-110. Acesso em: 4 dez. 2019.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J.; Abrahamsohn, P. *Histologia básica: texto e atlas*. 13. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2017. Acesso em: 2 dez. 2019.

K. Rezwan, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, **Biomaterials** 27 (2006) 413–3431, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006>. Acesso em: 3 dez. 2019.

Kaur, K., Singh, K. J., Anand, V., Bhatia, G., Singh, A. P., & Kaur, M. (2019). *Elucidating the Role of Size of Hydroxyl Apatite Particles towards the Development of Competent Antiosteoporotic Bioceramic Materials: In Vitro and In Vivo Studies*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. doi:10.1002/jbm.a.36687. Acesso em: 4 dez. 2019.

Köse, S., Kankilic, B., Gizer, M., Ciftci Dede, E., Bayramli, E., Korkusuz, P., & Korkusuz, F. (2018). *Stem Cell and Advanced Nano Bioceramic Interactions*. **Novel Biomaterials for Regenerative Medicine**, 317–342. doi:10.1007/978-981-13-0947-2\_17. Acesso em: 4 dez. 2019.

Lam, A. T.-L., Sim, E. J.-H., Shekaran, A., Li, J., Teo, K.-L., Goggi, J. L., ... Oh, S. K.-W. (2019). *Sub-confluent culture of human mesenchymal stromal cells on biodegradable polycaprolactone microcarriers enhances bone healing of rat calvarial defect*. **Cytotherapy**. doi:10.1016/j.jcyt.2019.03.004. Acesso em: 5 dez. 2019.

Lee, J. W., Kim, H., & Lee, K. Y. (2016). Effect of spacer arm length between adhesion ligand and alginate hydrogel on stem cell differentiation. **Carbohydrate Polymers**, 139, 82–89. doi:10.1016/j.carbpol.2015.12.024. Acesso em: 4 dez. 2019.

Levengood SKL, Zhang M (2014) Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. **J Mater Chem B** 2(21):3161–3184. Acesso em: 14 dez. 2019.

Lin, Yucheng et al. “In vitro behavior of tendon stem/progenitor cells on bioactive electrospun nanofiber membranes for tendon-bone tissue engineering applications.” **International journal of nanomedicine** vol. 14 5831-5848. 26 Jul. 2019, doi:10.2147/IJN.S210509. Acesso em: 11 dez. 2019.

Ma, H., Feng, C., Chang, J., & Wu, C. (2018). 3D-printed Bioceramic Scaffolds: from Bone Tissue Engineering to Tumor Therapy. **Acta Biomaterialia**. doi:10.1016/j.actbio.2018.08.026. Acesso em: 13 dez. 2019.

Mao, D., Li, Q., Li, D., Tan, Y., & Che, Q. (2018). *3D porous poly( $\epsilon$ -caprolactone)/58S bioactive glass–sodium alginate/gelatin hybrid scaffolds prepared by a modified melt molding method for bone tissue engineering*. **Materials & Design**. doi:10.1016/j.matdes.2018.08.062. Acesso em: 5 dez. 2019.

Maurmann, N.; Siqueira, Renato L.; Pavulack, D. P.; Briao, M. M. M.; Zanotto, E. D. ; Pranke, P. Viability of Keratinocytes Cultivated with Bioactive Ceramics. **10º Congresso Latino-Americano De Órgãos Artificiais E Biomateriais (COLAOB)**. Sociedade Latino Americana de Biomateriais e Órgãos Artificiais (SLABO). João Pessoa - Paraíba, 2018. Acesso em: 8 dez. 2019.

Maurmann, N. et al. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 3, n. 4, p. 45005, jun. 2017. Acesso em: 5 dez. 2019.

McGovern, Jacqui Anne et al. “Animal models for bone tissue engineering and modelling disease.” **Disease models & mechanisms** vol. 11,4 dmm033084. 23 Apr. 2018, doi:10.1242/dmm.033084. Acesso em: 8 dez. 2019.

Mckee, C.; Chaudhry, G. R. Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 159, p. 62–77, nov. 2017. Acesso em: 13 dez. 2019.

Morais, D. S., Rodrigues, M. A., Silva, T. I., Lopes, M. A., Santos, M., Santos, J. D., & Botelho, C. M. (2013). *Development and characterization of novel alginate-*

*based hydrogels as vehicles for bone substitutes. Carbohydrate Polymers*, 95(1), 134–142. doi:10.1016/j.carbpol.2013.02.067. Acesso em: 6 dez. 2019.

Nazeer, M. A., Yilgor, E., & Yilgor, I. (2019). Electrospun polycaprolactone/silk fibroin nanofibrous bioactive scaffolds for tissue engineering applications. **Polymer**. doi:10.1016/j.polymer.2019.02.023. Acesso em: 7 dez. 2019.

Neogi, T. “The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis.” **Osteoarthritis and cartilage** vol. 21,9 (2013): 1145-53. doi:10.1016/j.joca.2013.03.018. Acesso em: 4 dez. 2019.

Nowicki, M., Zhu, W., Sarkar, K., Rao, R., & Zhang, L. G. (2019). 3D Printing Multiphasic Osteochondral Tissue Constructs with Nano to Micro Features via PCL based Bioink. **Bioprinting**, e00066. doi:10.1016/j.bprint.2019.e00066. Acesso em: 7 dez. 2019.

Orshesh, Z., Borhan, S., & Kafashan, H. (2019). Physical, mechanical and in vitro biological evaluation of synthesized biosurfactant-modified silanated-gelatin/sodium alginate/45S5 bioglass bone tissue engineering scaffolds. **Journal of Biomaterials Science**, Polymer Edition, 1–12. doi:10.1080/09205063.2019.1675226. Acesso em: 14 dez. 2019.

Pape, H.-C., Giannoudis, P., & Krettek, C. (2002). *The timing of fracture treatment in polytrauma patients: relevance of damage control orthopedic surgery* **The American Journal of Surgery**, 183(6), 622–629. doi:10.1016/s0002-9610(02)00865-6. Acesso em: 10 dez. 2019.

Phukan, R.; Herzog, T.; Boland, P.J.; Healey, J.; Rose, P.; Sim, F.H.; Yazsemiski, M.; Hess, K.; Osler, P.; DeLaney, T.F.; et al. How Does the Level of Sacral Resection for Primary Malignant Bone Tumors Affect Physical and Mental Health, Pain, Mobility, Incontinence, and Sexual Function? **Clinical Orthopaedics and Related Research** 2016, 474, 687–696. Acesso em: 3 dez. 2019.

R Christiani, E Baroncini, J Stanzione, A J Vernengo, *In vitro* evaluation of 3D printed polycaprolactone scaffolds with angle-ply architecture for annulus fibrosus tissue engineering, **Regenerative Biomaterials**, Volume 6, Issue 3, June 2019, Pages 175–184, <https://doi.org/10.1093/rb/rbz011>. Acesso em: 5 dez. 2019.

Rauch, F.; Glorieux, F.H. Osteogenesis imperfecta. **Lancet** 2004, 363, 1377–1385. Acesso em: 4 dez. 2019.

Sattary, M., Rafienia, M., Kazemi, M., Salehi, H., & Mahmoudzadeh, M. (2018). Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering: C**. doi:10.1016/j.msec.2018.12.030. Acesso em: 15 dez. 2019.

Schemitsch, E.H. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! **Journal of Orthopaedic Trauma** 2017, 31, 20–22. Acesso em: 14 dez. 2019.

Schmidt, L. E., Hadad, H., Vasconcelos, I. R. de, Colombo, L. T., da Silva, R. C., Santos, A. F. P., ... Souza, F. Á. (2019). Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. **Journal of Functional Biomaterials**, 10(2), 21. doi:10.3390/jfb10020021. Acesso em: 8 dez. 2019.

Schuit, S.C.E.; Van der Klift, M.; Weel, A.E.A.M.; De Laet, C.E.D.H.; Burger, H.; Seeman, E.; Hofman, A.; Uitterlinden, A.G.; Van Leeuwen, J.P.T.M.; Pols, H.A.P. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: The Rotterdam Study. **Bone** 2004, 34, 195–202. Acesso em: 7 dez. 2019.

Shi, R., Xue, J., He, M., Chen, D., Zhang, L., & Tian, W. (2014). *Structure, physical properties, biocompatibility and in vitro/vivo degradation behavior of anti-infective polycaprolactone-based electrospun membranes for guided tissue/bone regeneration*. **Polymer Degradation and Stability**, 109, 293–306. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.07.017. Acesso em: 14 dez. 2019.

Shim, J.-H., Jeong, J., Won, J.-Y., Bae, J.-H., Ahn, G., Jeon, H., ... Huh, J.-B. (2017). Porosity effect of 3D-printed polycaprolactone membranes on calvarial defect model for guided bone regeneration. **Biomedical Materials**, 13(1), 015014. doi:10.1088/1748-605x/aa9bbc. Acesso em: 15 dez. 2019.

Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., & Rao, S. (2018). PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. **Molecular**

**Biotechnology**, 60(7), 506–532. doi:10.1007/s12033-018-0084-5. Acesso em: 4 dez. 2019.

Siqueira, R. L., Maurmann, N., Burguêz, D., Pereira, D. P., Rastelli, A. N. S., Peitl, O., ... Zanotto, E. D. (2017). *Bioactive gel-glasses with distinctly different compositions: Bioactivity, viability of stem cells and antibiofilm effect against Streptococcus mutans*. **Materials Science and Engineering: C**, 76, 233–241. doi:10.1016/j.msec.2017.03.056. Acesso em: 4 dez. 2019.

Sun, H., Mei, L., Song, C., Cui, X., & Wang, P. (2006). The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. **Biomaterials**, 27(9), 1735–1740. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.019. Acesso em: 7 dez. 2019.

Tahmasebi, A., Enderami, S. E., Saburi, E., Islami, M., Yaslianifard, S., Mahabadi, J. A., ... Shapouri Moghadam, A. (2019). *MicroRNA incorporated electrospun nanofibers improve osteogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. doi:10.1002/jbm.a.36824. Acesso em: 11 dez. 2019.

Tauer, Josephine T et al. "Osteogenesis Imperfecta: New Perspectives From Clinical and Translational Research." **Journal of Bone and Mineral Research plus** vol. 3,8 e10174. 20 Feb. 2019, doi:10.1002/jbm4.10174. Acesso em: 4 dez. 2019.

Theodoridis, K., Aggelidou, E., Vavilis, T., Manthou, M. E., Tsimponis, A., Demiri, E. C., ... Kritis, A. (2019). *Hyaline cartilage next generation implants from Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells: Comparative study on 3D-Printed Polycaprolactone scaffold patterns*. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. doi:10.1002/term.2798. Acesso em: 6 dez. 2019.

Valainis, D., Dondl, P., Foehr, P., Burgkart, R., Kalkhof, S., Duda, G. N., ... Poh, P. S. P. (2019). *Integrated additive design and manufacturing approach for the bioengineering of bone scaffolds for favorable mechanical and biological properties*. **Biomedical Materials**. doi:10.1088/1748-605x/ab38c6. Acesso em: 5 dez. 2019.

Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Manivasagan, P., Kang, K.-H., & Kim, S.-K. (2015). Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *International*

**Journal of Biological Macromolecules**, 72, 269–281.  
doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008. Acesso em: 2 dez. 2019.

Venugopal, J. R.; Prabhakaran, M. P.; Mukherjee, S.; Ravichandran, R.; Dan, K.; Ramakrishna, S., Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. **Journal of the Royal Society Interface** 2012, 9, (66), 1-19. Acesso em: 3 dez. 2019.

Wang, Y., Hu, X., Dai, J., Wang, J., Tan, Y., Yang, X. Zhang, Y. (2017). *A 3D graphene coated bioglass scaffold for bone defect therapy based on the molecular targeting approach.* **Journal of Materials Chemistry B**, 5(33), 6794–6800. doi:10.1039/c7tb01515a. Acesso em: 14 dez. 2019.

Whitman, D. H., Berry, R. L., & Green, D. M. (1997). Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 55(11), 1294–1299. doi:10.1016/s0278-2391(97)90187-7. Acesso em: 4 dez. 2019.

Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. (2002). The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques. **Tissue Engineering**, 8(1), 1–11. doi:10.1089/107632702753503009. Acesso em: 8 dez. 2019.

## ANEXO



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRO-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 35450

**Título:** DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO OSSEO A PARTIR DA ASSOCIACAO DE BIOMATERIAIS COM CELULAS-TRONCO

**Vigência:** 01/10/2018 à 31/03/2020

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE - coordenador desde 01/10/2018

NATASHA MAURMANN - pesquisador desde 01/10/2018

Bruno Jose da Costa Alcantara - Aluno de Mestrado desde 01/10/2018

Marina Moraes Mattarredona Brião - Aluno de Mestrado desde 01/10/2018

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 08/10/2018 - SALA 330 DO PRÉDIO ANEXO I DA REITORIA, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 77 ratos Wistar adultos (idade entre 12 e 16 semanas) que serão obtidos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Quinta-Feira, 25 de Outubro de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética