



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**THAIS LEAL RABELLO**

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE MATRIZ  
EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E FETAL**

VITÓRIA, ES

2023

**THAIS LEAL RABELLO**

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE MATRIZ  
EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E FETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira

VITÓRIA, ES

2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

L433d LEAL RABELLO, THAIS, 1998-  
DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE  
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E  
FETAL / THAIS LEAL RABELLO. - 2023.  
64 f. : il.

Orientador: BRENO VALENTIM NOGUEIRA.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Biotecnologia. 2. Ossos - Enxerto. 3. 2. Ossos –  
Regeneração. 4. Materiais biomédicos. 5. Matriz extracelular. I.  
VALENTIM NOGUEIRA, BRENO. II. Universidade Federal  
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---

**THAIS LEAL RABELLO**

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE MATRIZ  
EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E FETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Avaliada em 20 de março de 2023.

**Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

**Prof. Dr. Carlos Magno da Costa**  
**Maranduba**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Examinador Externo**

**Prof. Dra. Flavia de Paula**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Examinador Interno**

VITÓRIA, ES

2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

Ata da 216ª sessão de Defesa da Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente THAIS LEAL RABELLO, realizada às 14:00h do dia 20 de março de 2023. Dissertação intitulada “DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E FETAL”. A sessão pública foi realizada em formato online, com transmissão por meio de videoconferência (<https://meet.google.com/hgo-tneu-jeo>), conforme autorização do Regulamento Geral da Pós-Graduação da Universidade Federal do Espírito Santo - RESOLUÇÃO/CEPE/UFES/Nº 3, de 28 de janeiro de 2022 que autoriza as sessões de defesa em forma remota. O presidente da Banca, Prof. Dr. BRENO VALENTIM NOGUEIRA (orientador), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Profª. Drª. FLAVIA DE PAULA, como membro titular interno; Prof. Dr. CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (UFJF), como membro externo, e passou a palavra para a aluna que apresentou a sua proposta de dissertação. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar APROVADA a mestranda THAIS LEAL RABELLO na defesa de Mestrado. Eu, Breno Valentim Nogueira, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé.

Vitória, 23 de março de 2023.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Prof. Dr. Flavia de Paula  
Universidade Federal do Espírito Santo – Membro interno

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba  
Universidade Federal de Juiz de Fora – Membro externo



Documento assinado digitalmente  
CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA  
Data: 24/03/2023 19:30:19-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820  
Departamento de Morfologia - DM/CCS  
Em 23/03/2023 às 18:18

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/675570?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
FLAVIA DE PAULA - SIAPE 2441743  
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN  
Em 24/03/2023 às 10:30

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/675980?tipoArquivo=O>

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a mim mesma por ter me mantido firme mesmo com tantas turbulências durante esse período.

Agradeço a minha família pelo apoio de sempre: Aline, Sérgio, Júlia, Joana e João. Amo muito vocês, mesmo vocês não fazendo ideia do tema do meu mestrado.

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante essa caminhada, obrigada pela companhia e pelas risadas compartilhadas: Letícia e Layana. Agradeço em especial ao Ezio por toda a ajuda que me deu nessa reta final, seja através de ideias, seja através da sua simples presença. Guardo com muito carinho todas as nossas saídas, em especial, na casa da Fernanda.

Agradeço em especial meus Bioboners preferidos: Affonso e Fernanda, por terem me escutado e ter me dado apoio quando mais precisei. Vou levar esses momentos com vocês pelo resto da minha vida. Amo vocês

Agradeço a todo pessoal do NBT, em especial Gabriel, pelo apoio nas análises estatísticas.

Agradeço também ao chefe Biobone e praticamente meu co-orientador: Rodolpho, pelas ideias mirabolantes e pelo apoio durante caminhada.

Agradeço aos técnicos do LUCAR, Tadeu e Flavio por todo apoio que me deram, principalmente nessa reta final. Realmente não sei o que seria dessa dissertação sem a ajuda de vocês. Meus muito obrigada de coração.

Agradeço ao pessoal do CPID e LABIOM, que foram corresponsáveis pela realização de quase todas as análises feitas nesse projeto.

Agradeço a minha a psicóloga Janayna, pela grande ajuda durante os momentos mais desafiadores dessa jornada.

Agradeço ao meu orientador, Professor Breno Valentim, por ter me aceitado nesse time e nesse projeto tão incrível que me fez aprender muito. Obrigada pela sabedoria, orientação e humanidade.

Agradeço a Alexandra Elbakyan, fundadora do Sci-Hub, pois sem sua luta pelo acesso gratuito da informação científica não haveria possibilidade dessa e de inúmeras outras pesquisas.



Agradeço a Professora Flavia de Paula e sua equipe do NGHM pelo fornecimento de células e materiais para realização desse projeto.

Agradeço ao Professor Carlos Maranduba e Professora Flavia de Paula, por terem aceitado com muito carinho participar dessa banca de mestrado.

Por fim, agradeço as agências de financiamento FAPES (Edital N° 01/2020 – SPIN OFF; T.O. N° 105/2021) CAPES e ao ICEPI.

*“A ciência será sempre uma busca,  
jamais uma descoberta.  
É uma viagem, nunca uma chegada.”*

Karl Popper

## RESUMO

RABELLO, T.L. **Desenvolvimento de hidrogel derivado de matriz extracelular óssea bovina adulta e fetal**. 2023. 64f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O envelhecimento populacional e o aumento no número de procedimentos médicos e odontológicos que requerem enxertos ósseos levam à busca crescente por novos biomateriais. Nesse sentido, biomateriais feitos a partir de hidrogéis vem sendo desenvolvidos para acelerar e melhorar a qualidade do reparo do tecido ósseo. Os hidrogéis são polímeros hidratados que mimetizam a estrutura de tecidos vivos. A composição da matriz extracelular (MEC) óssea de origem fetal apresenta características semelhantes aos de tecidos em crescimento e cicatrização óssea, podendo ser explorada de forma promissora no desenvolvimento de hidrogéis capazes de acelerar a regeneração óssea. Assim, objetivamos desenvolver um hidrogel derivado de MEC óssea fetal e adulta e avaliar o seu potencial biológico a partir de sua caracterização, biocompatibilidade e de seu potencial de diferenciação osteogênica. Nesse estudo, foi quantificado o DNA, SDS e hidroxiprolina e os hidrogéis foram caracterizados a partir de análise por infravermelho, análise elementar e microscopia eletrônica de varredura. Para avaliação *in vitro* foi utilizado células-tronco mesenquimais humanas no ensaio de proliferação e viabilidade celular e na diferenciação osteogênica. Os resultados demonstraram uma eficiência na descélularização com redução de 99% do conteúdo de DNA para o tecido ósseo fetal e 78% para o adulto e preservação de componentes da MEC como colágeno. Foi demonstrado também uma viabilidade celular de 76% para o hidrogel adulto e 65% para o hidrogel fetal, com possível interferência do SDS residual (0,03%). Os resultados de diferenciação osteogênica sugerem que o hidrogel fetal teve maior indução à diferenciação quando comparado ao controle e ao hidrogel adulto. O hidrogel desenvolvido nesse estudo apresentou-se biocompatível e com potencial para uso na bioengenharia de tecidos. Sendo que o hidrogel derivado de osso bovino fetal demonstrou possui características peculiares que lhe candidatam como um material promissor a ser utilizado nessa área.

Palavras-chave: Hidrogel; Matriz Extracelular óssea. Bioengenharia de tecidos. Osso Fetal. Células-tronco Mesenquimais.

# **DEVELOPMENT OF HYDROGEL DERIVED FROM ADULT AND FETAL BOVINE BONE EXTRACELULAR MATRIX**

## **ABSTRACT**

**RABELLO, T.L. Development of hydrogel derived from adult and fetal bovine bone extracelular matrix.** 2023. 64f. Dissertation - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Population aging and the increase in the number of medical and dental procedures that provide bone grafts lead to a growing search for new biomaterials. Thus, biomaterials made from hydrogels have been developed to accelerate and improve the quality of bone tissue repair. Therefore, the purpose of this study was to develop a hydrogel derived from fetal and adult bone extracellular matrix and evaluate its biological potential based on the characterization, evaluation of biocompatibility and osteogenic differentiation. For this purpose a decellularization protocol was applied followed by digestion, solubilization and gelation of the bone matrix. In this study, the decellularization process was evaluated based on the DNA, SDS and hydroxyproline quantification. The hydrogels were characterized using infrared spectroscopy (FTIR), elemental analysis (CHN) and scanning electron microscopy. MTT assay was evaluate in human mesenchymal stem cells for cell viability and proliferation analysis and the evaluation of osteogenic differentiation was performed based on the quantitative analysis of calcium. The results showed the most effective decellularization in bovine fetal bone tissue with a 99% DNA reduction content and preservation of bone extracellular matrix components such as collagen. It was also demonstrated a cell viability of 76% for the adult hydrogel and 65% for the fetal hydrogel, with possible interference of the residual SDS (0,03%) in the cell viability. The osteogenic differentiation results suggest that fetal hydrogel had a greater differentiation induction when compared with control and adult hydrogel. The hydrogel in this study showed biocompatibility and has a potential use in tissue bioengineering. The hydrogel derived from fetal bone tissue has shown to have characteristics that make it a candidate as a possible and promising material to be used in this área.

Key-Words: Hydrogel. Bone Extracellular Matrix. Tissue bioengineering. Fetal bone. Mesenchymal stem cells.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Blocos de ossos bovinos in natura (A). Bloco de osso bovino após a etapa de descelularização (B e C). Ossos moídos desmineralizados para a produção do hidrogel (C e D). Hidrogel derivado da MEC do osso (F e G). As figuras B, D e F representam amostras de origem adulta e as figuras C, E e G representam amostras de origem fetal.....37
- Figura 2.** Osso descelularizado adulto (A) e Fetal (B) observado na lupa. Aumento 10x. Barra de escala: 2mm.....38
- Figura 3.** Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco dos diferentes grupos. Fetal Controle (FC, n=8), Fetal Descelularizado (FD, n=8), Adulto Controle (AC, n=8), Adulto Descelularizado (AD, n=8). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\*\*p<0,01 descelularizados vs respectivos controles; Teste t não pareado)....38
- Figura 4.** Concentração de DNA em ng/mg de material seco dos diferentes grupos. Hidrogel adulto (HA, n=4) e Hidrogel Fetal (HF, n=4). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\*p<0,01 adulto vs fetal; Teste t não pareado). ....40
- Figura 5.** Curva padrão de SDS confeccionada com concentrações entre 0,25% e 0,01%. R=0,989. ....41
- Figura 6.** Detergente residual em amostras de hidrogel de origem adulta (HÁ, n=4) e de origem fetal (HF, n=4). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. ....41
- Figura 7.** Curva padrão de hidroxiprolina confeccionada com concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL. ....42
- Figura 8.** Concentração de hidroxiprolina por mL de tecido digerido. Adulto Controle (AC n=4), Fetal Controle (FC, n=4), Adulto Descelularizado (AD, n=4), Fetal Descelularizado (FD, n=4). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; Teste t não pareado. ....43
- Figura 9.** Análise de infravermelho evidenciando o espectro do hidrogel de origem fetal (linha preta) e o hidrogel de origem adulta (linha vermelha) de maneira comparativa e representativa. ....45
- Figura 10.** Análise elementar do hidrogel fetal (preto) e adulto (cinza) referente aos elementos carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM.....46

<b>Figura 11.</b> Inferência da porcentagem de proteína bruta no hidrogel adulto (HA) e no hidrogel fetal (HF). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (* $p < 0,0001$ fetal vs adulto; Teste <i>t</i> -student).	46
<b>Figura 12.</b> Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos hidrogéis de MEC de osso adulto (A, B e C) e de osso fetal (D, E e F). Barra de escala: A e D: 100 $\mu$ m, B e E: 50 $\mu$ m e C e F: 10 $\mu$ m. Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente.	48
<b>Figura 13.</b> Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 100 $\mu$ m, B: 50 $\mu$ m. Aumento de 100x e 200x, respectivamente.	49
<b>Figura 14.</b> Avaliação da proliferação celular por MTT do controle (n=7), hidrogel fetal (n=7) e hidrogel adulto (n=7) após 1 e 5 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; (** $p < 0,01$ dia 1 vs dia 5 dos respectivos ensaios. Teste <i>t</i> de student; * $p < 0,0001$ controle vs hidrogel fetal; # $p < 0,001$ controle vs hidrogel adulto; 2-way ANOVA. Teste de Tukey).	49
<b>Figura 15.</b> Imagens de microscopia da coloração com Vermelho de Alizarina evidenciando a diferenciação osteogênica. Células controle com (A) e sem (B) meio de diferenciação; Hidrogel Adulto (C e D) e Hidrogel Fetal (E e F) com meio indutor de diferenciação. Hidrogel Adulto (G) e Fetal (H) sem meio indutor de diferenciação. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100x. Barra de escala: A, C, D, E, F e H: 100 $\mu$ m; B: 20 $\mu$ m; G: 50 $\mu$ m	52
<b>Figura 16.</b> Coloração com Vermelho de Alizarina observado na placa de plástico para cultura. HA com MD: Hidrogel Adulto com meio de diferenciação osteogênico; HF com MD: Hidrogel Fetal com meio de diferenciação osteogênico; HÁ sem MD: Hidrogel Adulto sem meio de diferenciação osteogênico; HF sem MD: Hidrogel Fetal sem meio de diferenciação osteogênico; HÁ sem células: Hidrogel Adulto sem células; HF sem células: Hidrogel Fetal sem células.	53
<b>Figura 17.</b> Quantificação de cálcio com e sem meio indutor de diferenciação das amostras controle, hidrogel adulto e hidrogel fetal (** $p < 0,005$ hidrogel fetal sem meio osteogênico vs hidrogel fetal com meio osteogênico. Teste <i>t</i> de student; # $p < 0,001$ controle vs hidrogel fetal; * $p < 0,001$ hidrogel fetal vs hidrogel adulto 2-way ANOVA. Teste de Tukey).	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração da solução de descelularização e quantidade de lavagens desengordurantes dos ensaios feitos para estabelecer o protocolo de descelularização para o osso de origem adulta. ....	28
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

AD – Osso Adulto Descelularizado

BMP-2 – Proteína Morfogenética Óssea-2

AC – Osso Adulto Controle

CHN – Análise Elementar de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio

CPID – Centro De Pesquisa, Inovação E Desenvolvimento

CTM's – Células-Tronco Mesenquimais

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FC – Osso Fetal Controle

FD – Osso Fetal Descelularizado

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

GAGs – Glicosaminoglicanos

Gla – Ácido Gama Carboxiglutâmico

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico

HA – Hidrogel Adulto

HCl – Ácido Clorídrico

HF – Hidrogel Fetal

IPN – Redes Poliméricas Interpenetradas

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia Eletrônica De Varredura

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide



N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NBT – Núcleo de Bioengenharia Tecidual

NGHM-UFES – Núcleo de Genética Humana e molecular da UFES

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão Fosfato de Sódio

PG's – Proteoglicanos

PNC's – Proteínas não colágenas

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

Semi-IPN – Redes Poliméricas Semi-Interpenetradas

SFB – Soro Fetal Bovino

SIF/MAPA – Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Tris-HCl – Tris Hidroximetil Aminometano Cloridrato (HCl)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC) .....	14
1.2 ENXERTOS ÓSSEOS .....	16
1.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL .....	17
<b>1.3.1 Hidrogéis</b> .....	<b>18</b>
1.3.1.1 Classificação .....	19
1.3.1.1.1 Classificação de acordo com a origem .....	19
1.3.1.1.2 Classificação de acordo com a composição polimérica .....	19
1.3.1.1.3 Classificação baseada no tipo de reticulação .....	20
1.3.1.1.4 Classificação baseada na resposta à estímulos .....	21
1.3.1.2 Utilização na Bioengenharia Tecidual Óssea .....	21
1.3.1.2.1 Hidrogéis derivados de alginato .....	21
1.3.1.2.2 Hidrogéis derivados de colágeno .....	22
1.3.1.2.3 Hidrogéis derivados de Matriz Extracelular Óssea .....	23
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4 MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1 COLETA DE MATERIAL .....	27
4.2 DESCELULARIZAÇÃO .....	27
4.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL .....	29
4.4 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO .....	29
<b>4.4.1 Quantificação de DNA</b> .....	<b>29</b>
<b>4.4.2 Determinação de SDS Residual</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4.3 Análise Quantitativa de Colágeno</b> .....	<b>31</b>
4.5 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO (FTIR) .....	32
4.6 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN) .....	32
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	32
4.8 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS .....	32
<b>4.8.1 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTM's)</b> .....	<b>32</b>
<b>4.8.2 Avaliação da Proliferação e Viabilidade Celular</b> .....	<b>33</b>
4.9 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA NOS HIDROGÉIS .....	34
<b>4.9.1 Diferenciação Osteogênica</b> .....	<b>34</b>

4.9.2 Coloração com Vermelho de Alizarina S .....	34
4.9.3 Quantificação de Cálcio .....	34
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>36</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO.....	36
<b>5.1.1 Quantificação de DNA .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1.2 Determinação de SDS residual .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.3 Análise Quantitativa de Colágeno .....</b>	<b>42</b>
5.2 ANALISE POR INFRAVERMELHO (FTIR) .....	44
5.3 ANALISE ELEMENTAR (CHN).....	45
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	47
5.5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS HIDROGEIS .....	48
<b>5.5.1 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTM's).....</b>	<b>48</b>
<b>5.5.2 Avaliação Da Proliferação e Viabilidade Celular .....</b>	<b>49</b>
5.6 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA NOS HIDROGÉIS .....	51
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma mistura complexa de proteínas estruturais e funcionais organizadas em uma ultraestrutura tridimensional (3D) única específica para cada tecido (SALDIN et al., 2017). Os principais componentes incluem colágeno, elastina, fibronectina, lamininas, glicoproteínas, proteoglicanos (PGs) e glicosaminoglicanos (GAGs), cada um com propriedades físicas e bioquímicas distintas. Embora existam vários componentes comuns entre as matrizes extracelulares, sua composição detalhada varia para cada tipo de tecido (YUE, 2014; GECKIL et al., 2010).

Dentre os componentes presente na MEC, o colágeno é a proteína mais abundante e corresponde a um terço do peso das proteínas corporais. Ele é uma estrutura formada em tripla hélice e todos os membros de sua família contem domínios com sequências de aminoácidos de repetição G-X-Y, onde G é glicina, e X e Y principalmente, resíduos de prolina e hidroxiprolina, respectivamente (FERREIRA et al., 2012; UNAL, CREECY; NYMAN, 2018).

As triplas hélices de colágeno individuais, conhecidas como tropocolágeno, se organizam de maneira complexa e hierárquica que levam a estruturas fibrilares e redes macroscópicas observadas nos tecidos, ossos e membranas basais (SHOULDERS; RAINES, 2009).

A MEC é um reservatório de fatores de crescimento e moléculas bioativas altamente dinâmica e de extrema importância, pois garante a regulação de diversas funções celulares como proliferação, adesão, migração, diferenciação e apoptose garantido a homeostase dos tecidos e órgãos (YUE, 2014; THEOCHARIS et al., 2016). Além disso, ela fornece resistência estrutural aos tecidos e mantém a arquitetura complexa dos órgãos (CANCEDDA, et al., 2009).

A MEC óssea se diferencia de outras matrizes que compõem os demais tecidos corporais por serem um sistema bifásico, sendo um terço composto por matéria orgânica, predominantemente fibras colágenas, e os dois terços restantes por matéria inorgânica, como fosfatos de cálcio tipo hidroxiapatita (BAI, et al., 2018). Na porção

orgânica do osso, o colágeno do tipo I é a proteína mais abundante e desempenha um papel fundamental na estrutura e função óssea.

É sabido que a quantidade de matriz orgânica óssea, varia de acordo com o desenvolvimento fetal e pós-natal nos mamíferos (QUELCH et al., 1983; CONN; TERMINE, 1985; WHITE, et al., 1991). Em humanos, a quantidade de matriz orgânica presente no osso fetal é superior comparados a adultos e, conseqüentemente, a quantidade de matriz mineralizada é maior em adultos quando comparados a ossos fetais (QUELCH et al., 1983; WHITE, et al., 1991). Isso acontece, pois, o processo de deposição de minerais acontece ao longo do desenvolvimento do organismo.

No processo de mineralização óssea estão envolvidas inúmeras proteínas, as chamadas proteínas não colágenas (PNC's). Essas proteínas constituem cerca de 10% da massa proteica óssea, e são elementos fundamentais para o processo de mineralização. Elas se dividem em três principais grupos: os proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas contendo ácido gama carboxiglutâmico (Gla). Embora já tenham sido isoladas para estudos, suas propriedades e funções para a matriz óssea ainda não bem são esclarecidas (CARVALHO, 2021).

Dentre as PNC's encontradas na matriz óssea, estão a sialoproteína óssea, envolvida no processo de nucleação da hidroxiapatita no osso, a osteocalcina, que tem uma importante função na regulação do metabolismo ósseo, a osteopontina, envolvida na regulação dos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea e a osteonectina, a proteína mediadora da ligação de  $Ca^{+}$  e apatita ao colágeno tipo I (GORSKI, 2011; CARVALHO, 2021).

Durante o processo de desenvolvimento do osso, desde o feto até a idade adulta, é sabido que os perfis de proteínas não colágenas variam tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Em fetos e recém-nascidos, a osteonectina é uma das PNC's mais abundantes na MEC óssea (CONN; TERMINE, 1985).

A matriz óssea fetal em desenvolvimento possui semelhança estrutural e de composição com as matrizes ósseas presentes nas zonas de crescimento e nos calos ósseos formados em áreas de cicatrização de fraturas, e apresentam características próprias que se diferenciam daquelas observadas na MEC adulta (BULLARD; LONGAKER; LORENZ, 2003; SWANSON; IOB; VIVIAN, 1937). Durante o desenvolvimento esquelético fetal e o reparo de fraturas em adultos, os programas

celulares e moleculares para a formação óssea são muito semelhantes (MICLAU et al., 2005; FERGUSON et al., 1999).

A cicatrização de feridas é um processo biológico complexo no qual várias vias metabólicas são ativadas e sincronizadas. Observações clínicas e dados experimentais sugerem que a cicatrização de feridas em tecidos fetais é diferente quando comparados a tecidos adultos (LONGAKER et al., 1991).

Em adultos, o processo de reparo de feridas leva a uma massa de tecido fibroso conhecida como cicatriz. Em contraste, os tecidos fetais quando lesionados podem ser completamente recriados, sem fibrose, em um processo semelhante à regeneração (GURTNER et al., 2008).

Diferente de outros tecidos, o osso tem a capacidade de regeneração verdadeira, isto é, não necessita de formar uma cicatriz fibrosa. Apesar disso, 5 a 10% das fraturas são propensas a não-união óssea por conta de traumas extensos e necessidade de retirada de tecido ósseo devido a tumores (HENKEL et al., 2013).

## 1.2 ENXERTOS ÓSSEOS

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são mais de 150 doenças, condições ou síndromes que estão relacionados com lesões ósseas, dentre elas: infecções (osteomielite), tumores ósseos, malformações congênitas e reumatismos (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014).

Além disso, no Brasil, insuficiências esqueléticas associadas a perdas ósseas dentárias por conta principalmente do envelhecimento populacional, já constituem um problema de Saúde Pública, devido à grande uma demanda de procedimentos restauradores (BRASIL, 2020).

Os tratamentos mais utilizados para fraturas e defeitos ósseos incluem principalmente enxertos e próteses metálicas. Para o procedimento de enxerto, o osso pode ser obtido através da própria pessoa (autoenxerto), de pessoa diferente (aloenxerto), de espécie diferente (xenoenxerto) ou mesmo pode utilizar um material sintético (CASTRO-SILVA, 2013).

O autoenxerto é considerado o padrão-ouro na medicina devido a suas propriedades biológicas e ausência de rejeição. Apesar de terem alcançado bons resultados clínicos, eles também trazem sérias desvantagens como infecção, dor, alto custo e

uma limitação em relação a quantidade de tecido que pode ser colhido sem comprometer o local doador (YUE, 2020). Os aloenxertos embora não comprometam o local doador, estão associados ao risco de resposta imune grave, transmissão de doenças e uma integração mais lenta no tecido nativo em comparação com enxertos autólogos (CHENG; SOLORIO; ALSBERG, 2014).

A demanda por enxertos ósseos é alta, e no mundo todo são mais de 2,2 milhões de procedimentos de enxerto ósseo realizados por ano em ortopedia e odontologia, sendo considerado o procedimento de transplante de tecido mais comum após a transfusão de sangue (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015). Estima-se que na Europa, o mercado de substitutos para enxerto ósseo movimentou cerca de US\$ 177 milhões em 2010, e no Brasil, somente o mercado de implantes dentários movimenta cerca de 1,5 milhão de reais a cada ano (ELIAS; VASCONCELLOS; RESENDE, 2012).

Apesar de muitos avanços, o reparo de tecidos ósseos ainda é um grande desafio na medicina regenerativa moderna. Terapias com enfoque na bioengenharia de tecidos são estratégias promissoras que no futuro poderão transformar o tratamento de doenças e regeneração de defeitos ósseos (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015; NOBRE, 2016).

### 1.3 BIOENGENHARIA TECIDUAL

A bioengenharia de tecidos é uma área da ciência que tem como objetivo substituir ou regenerar tecidos lesados, utilizando conhecimentos interdisciplinares para desenvolver tecidos artificiais (NOBRE, 2016).

Como consequência do desenvolvimento da bioengenharia de tecidos, obteve-se o desenvolvimento de novos biomateriais para regeneração óssea na medicina e na odontologia. Os biomateriais correspondem a materiais, com diferentes composições químicas, que interagem com os sistemas biológicos e são usados como *scaffolds* tridimensionais para regeneração ou substituição de tecidos (YUE, 2020).

Eles são divididos em metálicos, cerâmicos, compósitos ou poliméricos, podendo ser de origem natural ou sintética. Inicialmente, os biomateriais foram selecionados a partir de substâncias inertes que têm a menor toxicidade no corpo humano, como titânio ou ligas de titânio, aço inoxidável, carbono e outros metais e cerâmicas. Mais tarde, pelo fato dos biomateriais de origem natural, como os polímeros naturais de

colágeno, terem componentes importantes dos tecidos vivos e possuírem uma boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, eles são hoje muito utilizados na engenharia tecidual (BISWAS; DATTA, 2021; NOBRE, 2016).

São diversas as aplicações dos biomateriais na bioengenharia de tecidos, como por exemplo produção de lentes de contato, de próteses, materiais dentários, pensos para tratamento de feridas, encapsulação de fármacos (BISWAS; DATTA, 2021).

Atualmente, a maioria dos biomateriais são desenvolvidos para combinar alguns fatores ativos, hormônios ou outras substâncias com uma liberação controlada para induzir uma boa resposta celular, induzir a diferenciação celular e melhorar sobrevivência celular. O *scaffold* ideal para a engenharia tecidual óssea deve ter boa biocompatibilidade, biodegradabilidade, não ser tóxico e nem imunogênico e o material carreador deve ser adequado para adesão celular ou fator de crescimento (YUE, 2020).

### **1.3.1 Hidrogéis**

Dentro dos biomateriais de origem polimérica encontram-se os hidrogéis. Estes podem ser definidos como redes de polímeros em estrutura tridimensional com grande capacidade de retenção de água (CHAMPEAU, 2020). Sua estrutura, contida de água e porosidade, mimetiza a estrutura de tecidos, tornando-os propícios para a acomodação de células e liberação de substâncias solúveis, como fatores de crescimento e outras moléculas bioativas (CENSI et al., 2012).

Para o ramo da bioengenharia de tecidos, os hidrogéis surgiram como uma opção promissora, pois podem atuar como suporte tanto para o crescimento celular, preenchendo o espaço, quanto para fornecer moléculas bioativas que estimulam o crescimento tecidual (NOBRE, 2016; LEE; KIM, 2018).

O desenvolvimento de hidrogéis passou por quatro gerações. A primeira geração surgiu em 1960 e corresponde a redes poliméricas simples obtidas a partir de ligações químicas que foram desenvolvidas para serem usadas como lentes de contato ou para liberação de fármacos (YUE, 2020; NOBRE, 2016). Posteriormente, por volta dos anos setenta, surgiram os hidrogéis de segunda geração que são obtidos através do estabelecimento de interações físicas e diferem dos anteriores por serem responsivos à estímulos, sejam eles físicos, químicos ou bioquímicos. Isso permite uma aplicação



em casos onde a formação do gel ou a liberação do fármaco precisa ser em um local específico. Depois de cerca de 20 anos, surgiu a terceira geração de hidrogéis que corresponde a hidrogéis obtidos através de outras interações físicas, como estereocomplexação e complexação de inclusão. Esses hidrogéis foram desenvolvidos para melhorar e ajustar o desempenho de liberação de drogas e também conceder ao biomaterial melhores propriedades mecânicas (NOBRE, 2016). Atualmente, a química orgânica e a nanotecnologia têm sido aplicadas ao estudo de hidrogéis, dando aos hidrogéis de quarta geração novas propriedades e um elevado nível de precisão em relação à entrega de moléculas bioativas (YUE, 2020).

#### 1.3.1.1 Classificação

Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com suas diferentes propriedades, como origem, composição polimérica, tipo de reticulação e resposta às condições ambientais.

##### *1.3.1.1.1 Classificação de acordo com a origem*

De acordo com a origem, os hidrogéis podem ser naturais ou sintéticos. Dentre os sintéticos estão o óxido de polietileno, álcool polivinílico, ácido (poli) acrílico, poli(acrilamida) e polipeptídeos, e dentre os naturais estão os de alginato, quitosana, colágeno, ácido hialurônico e matriz extracelular (MEC) (SALDIN et al., 2017; LEE; KIM, 2018).

Hidrogéis de origem natural geralmente possuem uma boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas suas propriedades mecânicas são baixas. Ao contrário dos hidrogéis de origem sintética que tem boas propriedades mecânicas, porém baixa biocompatibilidade e atividade biológica (YUE, 2020).

Além disso, os hidrogéis de origem sintética são mais controláveis e reprodutíveis do que os de origem natural que podem variar de acordo com a sua fonte (NOBRE, 2016).

##### *1.3.1.1.2 Classificação de acordo com a composição polimérica*

De acordo com a composição química de seus polímeros e mecanismos de reticulação, os hidrogéis podem ser divididos em homopoliméricos, copoliméricos, redes poliméricas interpenetrantes (IPN) e redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN) (NOBRE, 2016; AHMED, 2015).

Os hidrogéis homopoliméricos correspondem a uma rede polimérica interligadas por uma única espécie de monomero hidrófilo. Diferente dos hidrogéis copoliméricos que são compostos por duas ou mais espécies diferentes de monômeros com pelo menos um componente hidrófilo (YUE, 2020; NOBRE, 2016).

No caso das redes poliméricas interpenetradas (IPN) para ocorrer a sua formação é necessária a combinação de dois ou mais polímeros em forma de rede. A formação do hidrogel ocorre por síntese ou reticulação de um dos polímeros em forma de rede na presença de outro já reticulado, sendo cada rede formada por um único tipo de polímero. Ou seja, há interpenetração das cadeias do segundo polímero com a rede do primeiro polímero obtendo-se, assim, uma rede fisicamente reticulada. Já as redes poliméricas semi-interpenetrantes (semi-IPN) o processo de formação é semelhante, no entanto um dos polímeros é reticulado e o outro é linear (NOBRE, 2016; AHMED, 2015).

A principal vantagem das redes poliméricas IPN é que eles produzem matrizes de hidrogel mais densas e com melhores propriedades mecânicas, podendo fazer o carregamento de drogas de forma mais eficiente e controlada. As redes poliméricas semi-IPN apesar de não terem propriedades mecânicas tão boas quanto as IPN, elas geralmente mantêm uma taxa de resposta dinâmica ao pH e a temperatura mais eficaz (YUE, 2020).

#### *1.3.1.1.3 Classificação baseada no tipo de reticulação*

Com base no tipo de reticulação, os hidrogéis podem ser divididos entre físicos e químicos. Os hidrogéis físicos resultam do estabelecimento de interações físicas entre as cadeias poliméricas, podendo ser interações iônicas, eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio. Já os hidrogéis químicos são resultantes de ligações químicas, ou seja, formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas (AHMED, 2015).

Com base nessas informações, pode-se dizer que os hidrogéis físicos são redes poliméricas com ligações reversíveis, enquanto que os hidrogéis químicos são redes poliméricas com ligações permanentes (NOBRE, 2016).

As interações iônicas são comumente usadas na preparação de hidrogéis de polissacarídeos naturais como os de alginato. Eles apresentam um grande potencial

para aplicação na bioengenharia de tecidos para regeneração óssea pois podem promover a adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos e células angiogênicas (HAN, et al., 2013; AHMED, 2015).

#### *1.3.1.1.4 Classificação baseada na resposta à estímulos*

Alguns hidrogéis podem modificar-se em resposta a estímulos físicos, químicos ou bioquímicos. Essas mudanças podem ser no nível da retenção de água (podendo reter mais ou menos), na estrutura da rede, permeabilidade ou na resistência. Os estímulos físicos estão relacionados a luz, pressão, e campos elétricos ou magnéticos, os estímulos químicos a temperatura, presença de moléculas específicas e mudança nas suas concentrações e os bioquímicos a presença de antígenos ou enzimas (NOBRE, 2016; AHMED, 2015).

#### *1.3.1.2 Utilização na Bioengenharia Tecidual Óssea*

Para serem utilizados na bioengenharia de tecidos, os hidrogéis devem possuir algumas características, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, adequada resistência mecânica e estrutura favorável à adesão, proliferação e sobrevivência celular, mimetizando ao máximo a matriz extracelular (NOBRE, 2016).

A vantagem da utilização dos hidrogéis é o fato deles proporcionarem um ambiente aquoso favorável ao crescimento e sobrevivência celular, transporte de nutrientes, e permitirem a incorporação e liberação controlada de moléculas bioativas. Além disso, eles podem ser adaptados para obter a geometria desejada para implantação ou injeção (BAI et al., 2018). Porém, os hidrogéis possuem uma estrutura mecanicamente fraca (dependendo do polímero que lhes dá origem) e necessitam ser submetidos a processos de esterilização e purificação, o que confere uma certa desvantagem em sua utilização (NOBRE, 2016).

Dentre as diversas aplicações que os hidrogéis podem ter está a regeneração de tecido ósseo. Para essa aplicação, os hidrogéis mais utilizados são os de origem natural, como os de matriz extracelular, colágeno, alginato e quitosano por mimetizarem mais precisamente a estrutura da matriz extracelular.

##### *1.3.1.2.1 Hidrogéis derivados de alginato*

O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marrons e é composto por dois principais monômeros: ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico. Esses monômeros

são arranjados em estrutura de blocos, e sua composição e distribuição varia de acordo com a origem do alginato (MAHALIA, 2021). O hidrogel de alginato é produzido majoritariamente pela reticulação com cloreto de cálcio, carbonato de cálcio ou sulfato de cálcio (AMARAL, 2019).

Na engenharia de tecidos, o alginato é comumente utilizado devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, alta disponibilidade e simplicidade do processo de gelificação (MAHALIA, 2021; AMARAL, 2019). Eles são utilizados principalmente para entrega de drogas e cicatrização de feridas (LEE; MOONEY, 2012).

Os hidrogéis de alginato encontraram potencial na regeneração óssea por meio da entrega de fatores osteoindutores, células osteogênicas ou combinação de ambos. Estudos demonstrando a eficiência de hidrogéis de alginato combinados com fatores de crescimento já comprovaram capacidade de promover a diferenciação osteogênica e regeneração do tecido ósseo (LEE; MOONEY, 2012).

No ano de 2005, Park e colaboradores desenvolveram um hidrogel híbrido de alginato e quitosana enriquecido com células-tronco mesenquimais e proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) para testes em camundongos. Seus resultados apontaram para formação de osso trabecular e demonstrou ser um potencial biomaterial para ser utilizado na clínica para reparo de tecido ósseo (PARK et al., 2005).

Esse gel apresenta vantagens em comparação com outros materiais, devido à sua capacidade de ser introduzido no corpo de forma minimamente invasiva e a liberação de drogas e fatores de crescimento ser controlada. Porém, problemas relacionados à reação imune podem ser muito comuns, e em geral, são causados por impurezas, sendo necessário processos rigorosos de purificação para suas aplicações (LEE; MOONEY, 2012; AMARAL, 2019).

#### *1.3.1.2.2 Hidrogéis derivados de colágeno*

Na engenharia de tecidos, o colágeno é o polímero natural mais amplamente utilizado devido à sua composição ser favorável à adesão, migração e diferenciação celular além de serem biocompatíveis e biodegradáveis. Com base nisso, Ma et al. (2016) estudaram o uso de hidrogéis de colágeno para regeneração tecidual óssea. Eles prepararam um hidrogel híbrido contendo colágeno, hidroxiapatita e alendronato (um fármaco usado para o tratamento da osteoporose) para testes *in vitro*. Nesse estudo,

foram preparados hidrogéis com diferentes proporções de hidroxiapatita e de alendronato para fins comparativos, e para a realização dos testes de adesão e proliferação celular foi usada uma linhagem celular de pré-osteoblastos de murinos. Como resultados, os hidrogéis apresentaram boas propriedades mecânicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade e promoção da adesão e proliferação celular. Em suma, esses hidrogéis apresentaram potencial para aplicação como *scaffolds* para engenharia de tecido ósseo, porém, por terem sido realizados apenas testes *in vitro*, é necessária a realização de mais estudos para maior compreensão desse biomaterial em organismos vivos (MA et al., 2016).

#### 1.3.1.2.3 Hidrogéis derivados de Matriz Extracelular Óssea

A MEC óssea é composta por cerca de 70% de matéria inorgânica, como fosfatos de cálcio tipo hidroxiapatita (BAI, et al., 2018). Por esse motivo, para a MEC óssea ser utilizada na engenharia de tecidos, é necessário além do processo de remoção de células, um processo de remoção de seus minerais (SPANG; CHRISTMAN, 2018).

No ano de 2013, Sawkins e colaboradores estabeleceram um protocolo de descelularização da MEC óssea desmineralizada preparada a partir de osso bovino, e caracterizou sua a estrutura e composição. Além disso, eles produziram uma forma solúvel MEC que pode ser induzida a formar um hidrogel. Nesse estudo foi utilizado células calvárias primárias de camundongo para testes *in vitro*. Como resultados, os hidrogéis derivados de MEC óssea tiveram maior proliferação celular em comparação com hidrogéis derivados de colágeno tipo I. Esses resultados mostraram que hidrogéis derivados de MEC têm propriedades estruturais, mecânicas e biológicas distintas de outros tipos de hidrogéis e matrizes e têm o potencial para entrega de drogas e fatores bioativos (SAWKINS et al., 2013).

Muito semelhante a esse, o estudo de Paduano et al. (2017) objetivou avaliar o comportamento de células-tronco da polpa dentária em *scaffolds* de hidrogel derivados de MEC óssea descelularizada em comparação com o colágeno tipo I. Nesse estudo, as células foram cultivadas em três condições diferentes: meio basal, meio osteogênico e meio suplementado com fatores de crescimento para investigar o crescimento celular, deposição mineral, expressão gênica e proteica. Os *scaffolds* de hidrogel se mostraram viáveis após três semanas e os níveis de expressão proteica de sialoproteína óssea e osteocalcina (marcadores de formação óssea) foram maiores

nos hidrogéis derivados de MEC em relação ao de colágeno (SPANG; CHRISTMAN, 2018; PADUANO et al., 2017). Esses resultados reforçaram a ideia de que hidrogéis derivados de MEC óssea podem ser considerados *scaffolds* adequados para apoiar a diferenciação osteogênica.

Esses estudos contribuíram para outros estudos que exploram os hidrogéis derivados de MEC em modelos *ex vivo* para reparo ósseo. Como exemplo, o estudo de Smith et al. (2014) utilizou um hidrogel híbrido de MEC bovina e alginato para avaliá-lo como veículo de entrega de fatores de crescimento em um modelo de defeito de fêmur de galinha *ex vivo* para reparo ósseo. Quando enriquecido com células-tronco humanas e colocadas no defeito ósseo, a aplicação do hidrogel no modelo *ex vivo* demonstrou um aumento na formação de matriz óssea e deposição de colágeno (SMITH et al., 2014).

Esses estudos reiteram a versatilidade dos hidrogéis de MEC como veículos de entrega de células-tronco e fatores de crescimento. No entanto, a diversidade de células-tronco e fatores de crescimento exige muita otimização e uma seleção cuidadosa para terapias complexas (SPANG; CHRISTMAN, 2018).

Em todos os estudos acima, foram utilizados MEC bovina de origem adulta para desenvolver os hidrogéis, por conta da sua disponibilidade no mercado. É sabido que a MEC de origem fetal possui diferenças na composição e podem apresentar características únicas que se diferenciam daquelas observadas na MEC de origem adulta (MELLO JR; FIELD; RILEY, 1978). Desse modo, podem ser estudadas e exploradas como um potencial biomaterial para a engenharia de tecidos.

Assim, de maneira inédita, esse trabalho irá desenvolver um hidrogel de MEC óssea bovina de origem fetal e adulta e caracteriza-lo para avaliar seu potencial biológico e contribuir para futuros estudos que visam a aplicação desse biomaterial para terapias de reparo ósseo na engenharia de tecidos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Esse estudo se justifica diante da busca por biomateriais que sejam biocompatíveis, biodegradáveis, que tenham adequada resistência mecânica e estrutura favorável à adesão, proliferação e sobrevivência celular para terapias que visam a regeneração óssea, uma vez que os biomateriais desenvolvidos até hoje ainda possuem limitações.

Além disso, a MEC de origem fetal pode apresentar características únicas que diferenciam daquelas observadas na MEC adulta, visto que possui semelhança na estrutura e composição com as matrizes presentes no osso em fase de cicatrização de fratura. Logo, o presente estudo se justifica pela possibilidade desenvolver um biomaterial a partir de MEC fetal bovina para avaliar seu potencial biológico e possível utilização na bioengenharia de tecidos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver hidrogel derivado de MEC óssea bovina adulta e fetal e avaliar seu potencial biológico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fazer a caracterização bioquímica dos hidrogéis de origem óssea adulta e fetal bovina.
2. Avaliar a biocompatibilidade dos hidrogéis *in vitro*.
3. Avaliar o potencial de indução de diferenciação osteogênica dos hidrogéis.



## 4 MATERIAS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NBT) e no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), com sede no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES) e também no Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento (CPID) localizado em Cariacica – ES com autorização prévia para experimentação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES – Processo 48/2018). Este trabalho teve financiamento concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) edital Nº 01/2020 – Projetos Inovadores e Spin-Off: T.O. 105/2021.

### 4.1 COLETA DE MATERIAL

Os ossos adultos e de fetos bovinos machos, com idade gestacional entre sete e oito meses de desenvolvimento, foram coletados imediatamente após o abate em abatedouro frigorífico (Frigorífico Cariacica S.A – MAFRICAL, Cariacica - ES) devidamente inspecionado e certificado pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SIF/MAPA/Brasil). Após a coleta, o material foi serrado em blocos que mediam aproximadamente 2,0 a 3,0 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura. Esses blocos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em caixas térmicas contendo gelo, e transportados até o NBT, local onde foram devidamente limpos, dissecados e selecionados. Para este estudo, foram selecionados os blocos que mais se aproximavam à medida desejada (2,0 a 3,0 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura). Após a seleção, todos os fragmentos ósseos foram lavados em água corrente e distribuídos em frascos de 500 mL contendo aproximadamente 50 gramas de blocos de ossos em cada frasco.

### 4.2 DESCCELULARIZAÇÃO

O protocolo de descelularização foi realizado com base no estudo de Barros (2016). Esse estudo estabeleceu um protocolo de descelularização para o osso de origem adulta e fetal, porém seus resultados obtiveram limitações. Em relação ao osso fetal, foi encontrado um resultado satisfatório de DNA, porém para o osso adulto o resultado foi insatisfatório.

Dessa forma, para estabelecer o protocolo de descelularização para o osso adulto, foram feitos ensaios utilizando diferentes concentrações de solução de descelularização contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e Ácido Etilenodiamino

Tetra-Acético (EDTA) e também diferentes quantidades de lavagens desengordurantes (1,2, 3 e 4) com Metanol/Clorofórmio (1:1) (Tabela 1). Todos esses ensaios foram realizados no NBT.

Tabela 1. Concentração da solução de descelularização e quantidade de lavagens desengordurantes dos ensaios feitos para estabelecer o protocolo de descelularização para o osso de origem adulta.

	<b>Ensaio 1</b>	<b>Ensaio 2</b>	<b>Ensaio 3</b>	<b>Ensaio 4</b>
Concentração da solução de descelularização	1% SDS + 0,2% EDTA	2% SDS + 0,4% EDTA	4% SDS + 1,6% EDTA	6% SDS + 3,2% EDTA
Quantidade de lavagens desengordurantes	1-4.	1-4.	1-4.	1-4.

Com base nos resultados de DNA (dados não mostrados) e na aparência dos blocos de ossos, foi estabelecido o protocolo de descelularização para o osso de origem adulta.

Para o processo de descelularização desse estudo, os blocos de ossos bovinos adultos e fetais foram levados ao CPID.

Os blocos de ossos adultos foram lavados por imersão com aproximadamente 400 mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) contendo SDS 4% e EDTA 1,6%, sob agitação contínua por 96 horas. As soluções foram trocadas a cada 12 horas e as lavagens de descelularização foram intercaladas com lavagens desengordurantes. Assim, a cada 24 horas os blocos de ossos foram submetidos à uma lavagem contendo 400 mL de solução de Metanol e Clorofórmio (proporção 1:1) por 1 hora seguida de duas lavagens com PBS (1x) por 30 minutos cada. Todas as lavagens foram feitas sob agitação contínua de 170 rpm à 37°C.

O protocolo de descelularização para o osso de origem fetal foi feito com base no estudo de Barros (2016). Os blocos de ossos fetais foram lavados por imersão com aproximadamente 400 mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) contendo SDS 1% e EDTA 0,4 %, sob agitação contínua por 96 horas. As soluções foram trocadas a cada 12 horas e não houve necessidade de lavagens desengordurantes.

Ao final do processo de descelularização, os ossos foram lavados com PBS (1x) por 48 horas sob agitação com troca de solução a cada 12 horas para remoção de

resíduos. Após essa lavagem o material foi submetido à uma solução clareadora contendo 35% de peróxido de hidrogênio seguido de duas lavagens de PBS (1x) por 30 minutos cada, todas sob agitação. Todas as lavagens com SDS, PBS e peróxido de hidrogênio realizadas nessa etapa foram realizadas na Incubadora Shaker SL-222 (Solab Científica).

Depois disso, os ossos lavados foram levados ao NBT para secagem em estufa à 37°C e moídos em um moinho com granulometria de 0,5-2 cm.

### 4.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL

Após a moagem, os ossos passaram por um processo de desmineralização para retirada dos minerais. A desmineralização foi feita com HCl (0,5M) a uma concentração de 25 mL/g de osso por 24 horas. Após esse processo, o osso passou por uma lavagem com ácido peracético 0,2% seguida de 10 lavagens de 15 minutos cada com água destilada na concentração de 100 mL/g e depois 2 com PBS (1x) estéril na mesma concentração. Após lavados, foram liofilizados e armazenados a -80°C até o uso.

A produção do hidrogel fetal e adulto foi feita de acordo com o protocolo de Sawkins et al. (2013) com algumas modificações. Os ossos moídos descelularizados e lavados foram digeridos com pepsina 1 mg/mL em HCl (0,01 M) formando a solução pré-gel 10 mg/mL, que foi armazenada a -20 °C até o uso.

A gelificação foi feita adicionando-se 1/10 do volume de PBS (10x) (pH 7,4) e NaOH (0,1M) até atingir o pH 7,4. Todas as soluções estavam mantidas a 4°C. Após isso, o pré-gel foi colocado a 37°C por 1 hora para a gelificação.

### 4.4 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

#### 4.4.1 Quantificação de DNA

Para realizar a análise de determinação de conteúdo de DNA, foi utilizado protocolo de extração salina anteriormente descrito na literatura (HANOTTE; BRUFORD; BURKE, 1992) com algumas adaptações. As amostras de ossos bovinos moídas Adulto Controle (AC, n=8), Adulto Descelularizado (AD, n=8), Fetal Descelularizado (FD, n=8) e Fetal Controle (FC, n=8) foram alocadas em microtubos de 2 mL estéreis contendo solução de lise composta por 410 µL de buffer de extração (0,2 mL Tris 1M pH 8 / 0,4mL NaCl 5M / 0,4 mL EDTA 0,5M pH 8 / 19 mL de água ultrapura), 80 µL de

SDS à 10% e 15µL de proteinase K (Ludwig Biotec) (20 µg/µL). Em seguida, os tubos foram incubados à 55 °C *overnight*. Após incubação, os tubos foram centrifugados a 13.700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos e a eles adicionados 180 µL de NaCl 5M, as amostras foram homogeneizadas até a formação de um precipitado de cor branca. Os tubos foram novamente centrifugados a 13.700 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente transferido para novos microtubos e foram adicionados 800 µL de isopropanol gelado. Os microtubos foram homogeneizados e centrifugados a 13.700 rpm, agora por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado. No tubo remanescente, foram adicionados 250 µL de etanol à 80% homogeneizados suavemente. Os microtubos foram centrifugados a 13.700 rpm por mais 7 minutos, e a eles novamente foram adicionados 250 µL de etanol à 80% e homogeneizados suavemente. Fez-se novamente a centrifugação dos microtubos a 13.700 rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. O etanol residual foi evaporado à 55 °C por 30 minutos em estufa estéril. O DNA contido nos microtubos das amostras foi ressuspensão em 50 µL de água ultrapura e mantidos *overnight* em geladeira (4 °C) para diluição. Por fim, procedeu-se com leitura em equipamento espectrofotômetro (Modelo NanoDrop® 2000, Thermo Scientific) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

#### **4.4.2 Determinação de SDS Residual**

A determinação de SDS residual foi realizada utilizando uma adaptação do ensaio de azul de metileno descrito anteriormente na literatura por Zvarova et al. (2016). Inicialmente, foi confeccionada uma curva padrão de SDS a partir de uma solução de SDS a 2%. Foram transferidos 1 mL da solução de SDS a 2 % para um tubo contendo 1 ml de azul de metileno a 0,0125%. A partir dessa solução, agora com concentração de SDS a 1%, foram realizadas diluições em 87 pontos distintos (0,5% até 0,01%) e em seguida prosseguiu-se com a leitura das diluições em triplicata à 650nm em Espectrofotômetro. Para a mensuração de SDS residual, foram utilizados os hidrogéis (fetal e adulto), todos eles realizados em quadriplicata. Para a quantificação, 5 µL de cada amostra foram transferidos para microtubos de 2 mL, e em seguida foram pipetados igualmente em cada tubo, volume de 495 µL de solução de azul de metileno à 0,0125%. As amostras foram agitadas e em seguida deixadas em repouso por 30 minutos. Posteriormente foi adicionado 1 mL de clorofórmio em cada microtubo,

depois agitadas e deixadas descansar por 30 minutos. As amostras foram lidas em triplicata na faixa de 650 nm em espectrofotômetro.

#### 4.4.3 Análise Quantitativa de Colágeno

Para quantificação do colágeno foi utilizado o teor do aminoácido hidroxiprolina e foi utilizado protocolo adaptado de métodos anteriormente descritos na literatura (EDWARDS; O'BRIEN, 1980; REDDY; ENWEMEKA, 1996).

Nessa análise, os ossos moídos *in natura* (controle) e descelularizados foram inicialmente desmineralizados com HCl (0,5M) por 24 horas (em agitação) a uma concentração de 25mL/g. Após a etapa de desmineralização, as amostras de tecido foram pesadas e acondicionados em tubos de 15 mL contendo 50 µL de hidróxido de sódio (7N) para realização de hidrólise alcalina. Como branco, foi utilizado um tubo contendo apenas 50 µL de hidróxido de sódio, que foi submetido a todas as etapas do processamento. Os tubos foram autoclavados à 120 °C ( $p \approx 98,1$  kPa) por 40 minutos. Posteriormente, foram adicionados aos tubos, o volume de 50 µL de ácido sulfúrico (3,5 M) para acidificação do hidrolisado. Neste momento, as amostras diluídas em 100 µL foram avolumadas, adicionadas com 900 µL de água destilada. Uma alíquota de 50µL foi transferida para novo microtubo.

A curva padrão de hidroxiprolina foi confeccionada a partir de solução com 1000 µg/mL do aminoácido. As diluições foram realizadas de forma seriada com água destilada na proporção 1:1, de modo que os diluídos presentes nos microtubos apresentavam concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL de hidroxiprolina. De cada microtubo diluído, também foram transferidos 50 µL para novos microtubos.

Foram adicionados aos microtubos de amostras, de alíquotas da curva padrão, e ao branco, 450 µL de Cloramina T (0,0025M). Após 25 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionados aos tubos 500 µL de reagente de Erlich (0,5M) e em seguida foram mantidos em banho maria a 60 °C por 15 minutos. Por fim, as amostras foram alíquotadas em microplaca de 96 poços, em triplicata, e foram lidas à absorbância de 560 nm em leitor de placa (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Os valores de absorbância obtidos foram calculados utilizando a equação da curva padrão.

#### 4.5 ANÁLISE POR INFRAVERMELHO (FTIR)

Amostras de hidrogel de origem fetal e adulta (n= 3), previamente liofilizadas, foram analisadas usando um espectroscópio (FT-MIR FTLA 2000 Bomem). Todos os espectros foram observados na faixa de 500 a 4500  $\text{cm}^{-1}$  para aquisição de dados, a uma taxa de 4  $\text{cm}^{-1}$ , com 50 varreduras para cada amostra, seguida de análise espectral para comparação. Todas as análises foram feitas no Origin Pro 8.5 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, EUA).

#### 4.6 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

Para quantificação dos elementos Carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N), amostras de hidrogel de origem fetal e adulta (n= 4) foram liofilizadas, pesadas e analisadas usando o FlashSmart Elemental Analyzer (Thermo Scientific, EUA). A inferência da porcentagem de proteína bruta foi determinada usando o fator proposto por Jones (1931): % proteína bruta = %N x 6.25.

#### 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras de hidrogel fetal e adulta foram liofilizadas e depois cobertas de ouro em metalizador (Desk V, Denton Vacuum). Para visualização das amostras e captura de imagens, foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JEM6610 LV operado a 20KV com filamento de Tungstênio).

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS

##### 4.8.1 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTM's)

Foram coletadas amostras de tecido adiposo humano de aproximadamente 0,5  $\text{cm}^2$  de diâmetro obtida de cirurgias ortopédicas de correção. A coleta das amostras foi realizada no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória (ES) que seguiram para o Núcleo de Genética Humana e Molecular da UFES (NGHM-UFES). Essa pesquisa teve aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos sob o número do parecer CAAE: 2.171.595.

O processo de cultura celular a partir do tecido adiposo coletado foi realizado baseado no protocolo de Zuk (2001). O fragmento de tecido adiposo coletado foi lavado extensivamente com PBS (1x), para a remoção de impurezas e cortado em fragmentos menores. Esses fragmentos foram cultivados em meio basal DMEM- *high glucose* (Invitrogen, South America) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino

(SFB) (Invitrogen, South America) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, EUA) e incubadas por 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Ao atingir uma confluência de 80-90 %, as células foram submetidas ao processo de cultura secundária.

Essas células foram então analisadas a partir de testes de diferenciação celular (condrogênica, adipogênica e osteogênica) e então sugeridas como células-tronco mesenquimais (CTM's) pelo grupo de pesquisa do NGHМ-UFES e cedidas ao NBT.

Para cultura de rotina, as CTM's foram incubadas a 37°C/5% CO<sub>2</sub> com meio basal StableCell™ DMEM- high glucose (Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, South América) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, EUA) e a troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias. As células foram visualizadas e fotografadas através do microscópio Axio Observer 3 da Zeiss.

#### **4.8.2 Avaliação da Proliferação e Viabilidade Celular**

Para a avaliação da proliferação e viabilidade celular, as CTM's foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 10<sup>3</sup>/poço e 100 µL de cada hidrogel (de origem adulta e fetal) foram adicionados. Como controle foi utilizado CTM's sem hidrogel. Após 1 e 5 dias de cultura, foi realizada a avaliação da proliferação celular utilizando o ensaio de MTT. Resumidamente, adicionou-se 50 µL de solução MTT (5mg mL<sup>-1</sup>) (Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, EUA), a 450 µL de DMEM High-Glicose, em cada poço e incubou-se durante 4 horas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico ácido (HCl 0,04M em isopropanol) e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 ° C para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm em um leitor de placas (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Os experimentos foram feitos em septuplicata (n=7).

Para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular, todos os valores de absorbância foram subtraídos pelo branco da amostra. Em seguida a absorbância do tratamento com hidrogel (adulto/fetal) foi dividida sobre a absorbância do controle, ou seja: viabilidade (%) = absorbância das células com hidrogel/absorbância das células controle.



## 4.9 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA NOS HIDROGÉIS

### 4.9.1 Diferenciação Osteogênica

A fim de avaliar a diferenciação osteogênica, as CTM's foram plaquedas em placas de 24 poços na densidade de  $10^3$ /poço. Após atingirem cerca de 70% de confluência, foram adicionados 500  $\mu$ L de hidrogel de origem adulta e fetal (n=4) e como controle foi utilizado CTM's sem hidrogel (n=4). As células controle e os hidrogéis foram induzidos com meio indutor de diferenciação contendo meio basal DMEM-high g licose, SFB 10% (v/v), antibiótico 1% (v/v) Dexametasona  $10^{-8}$  Mm 1% (v/v), 0,2 Mm ácido ascórbico 1% (v/v) e 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato 1% (V/V). As células foram induzidas a diferenciação por 14 dias e a troca do meio foi realizada a cada 3 dias.

Para verificar a indução da diferenciação nos hidrogéis, também foi utilizado um controle com hidrogel sem um meio indutor de diferenciação (n=4) e Hidrogel sem células (n=2). A troca também foi realizada com meio suplementado a cada 3 dias por 14 dias.

### 4.9.2 Coloração com Vermelho de Alizarina S

Com a finalidade de visualizar os depósitos de cálcio das células diferenciadas, houve a fixação das células com 4% (v/v) de paraformaldeído durante 24 horas. Após isso, as placas foram lavadas duas vezes com PBS (1x) e, em seguida, foi adicionado uma solução de corante contendo 1% de vermelho de alizarina S (Isofar, Duque de Caxias-RJ) e 1% de hidróxido de amônia na proporção de 10:1. Após 15 minutos, o excesso de corante foi removido com água destilada e as placas foram mantidas abertas até a secagem. As células foram visualizadas e fotografadas através do microscópio Axio Observer 3 da Zeiss.

### 4.9.3 Quantificação de Cálcio

A análise quantitativa de cálcio foi realizada de acordo com o protocolo de Almeida et al. (2015). Para quantificar o cálcio, 400  $\mu$ l, de uma solução contendo 1% de ácido acético e 1% de metanol na proporção de 4:1 foi adicionada em cada poço previamente corada com vermelho de alizarina. Após esta etapa as placas foram levadas para o agitador durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a absorbância foi medida a 495 nm em um leitor de placa (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Os experimentos foram realizados em quadruplicada.



#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Prisma (Prism 6, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi realizada avaliando a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk e utilizando o teste *t* de Student para amostras independentes e ANOVA de uma e duas vias seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

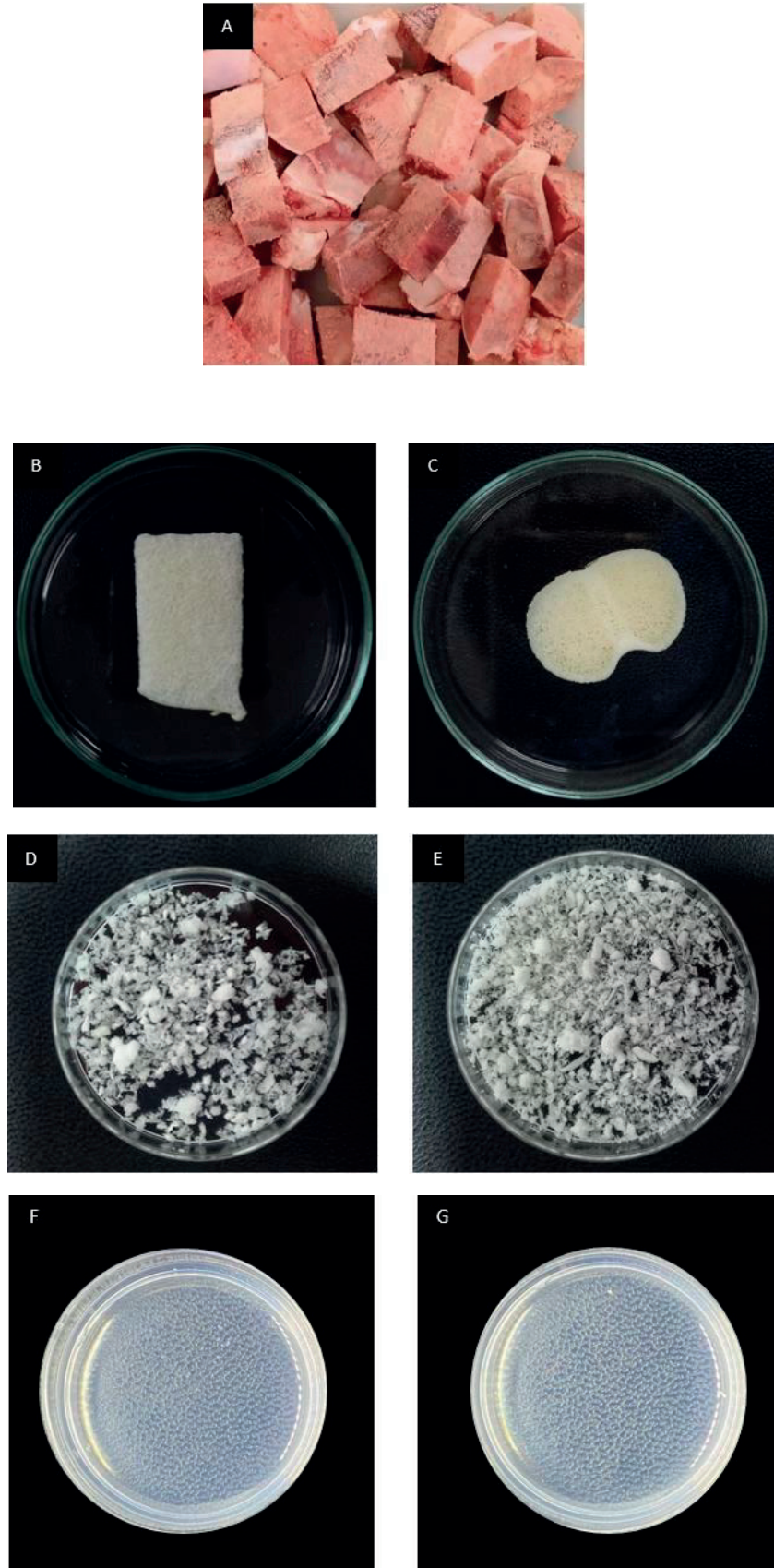
### 5.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

A descelularização dos blocos de ossos foi realizada utilizando o detergente SDS. Esse detergente atua solubilizando as membranas celulares e as membranas nucleicas, sendo muito eficaz para a remoção de células. Porém, também pode desnaturar proteínas, remover glicosaminoglicanos e fatores de crescimento e promover alterações na estrutura, composição e bioatividade na matriz (HE, et al., 2017).

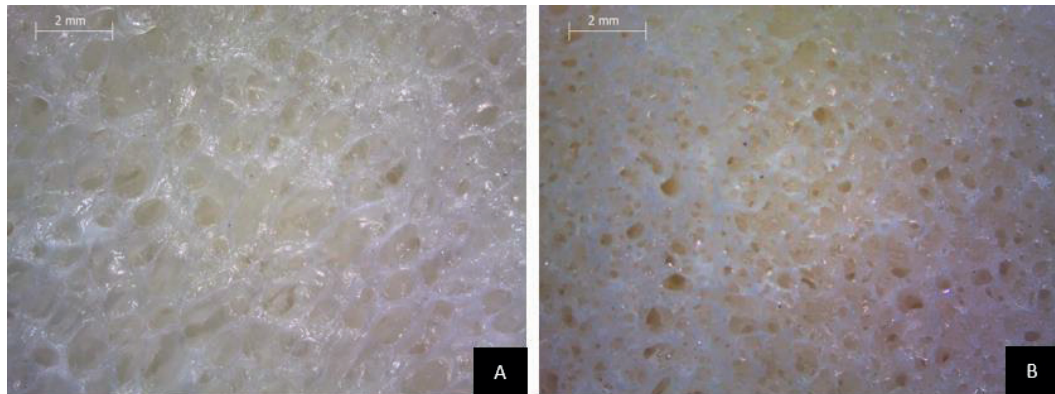
Para o processo de descelularização, o presente estudo utilizou uma solução de SDS com concentração quatro vezes maior para o osso adulto comparado ao osso fetal. Além disso, foram incluídas lavagens desengordurantes de Metal/Clorofórmio (proporção 1:1) para remoção de células adiposas no osso adulto.

Os blocos de ossos descelularizados de origem adulta e fetal apresentaram um aspecto esbranquiçado sugerindo uma remoção de células (SAWKINS et al., 2013). Após o processo de descelularização, os blocos de osso foram moídos e, em seguida, desmineralizados para produção do hidrogel (Figura 1). Os blocos de osso adulto apresentaram um maior tamanho de poro comparados com os blocos de osso fetal (Figura 2), que pode ter influenciado na eficiência da descelularização.

A avaliação da descelularização foi feita através da quantificação de DNA e de SDS residual e hidroxiprolina.



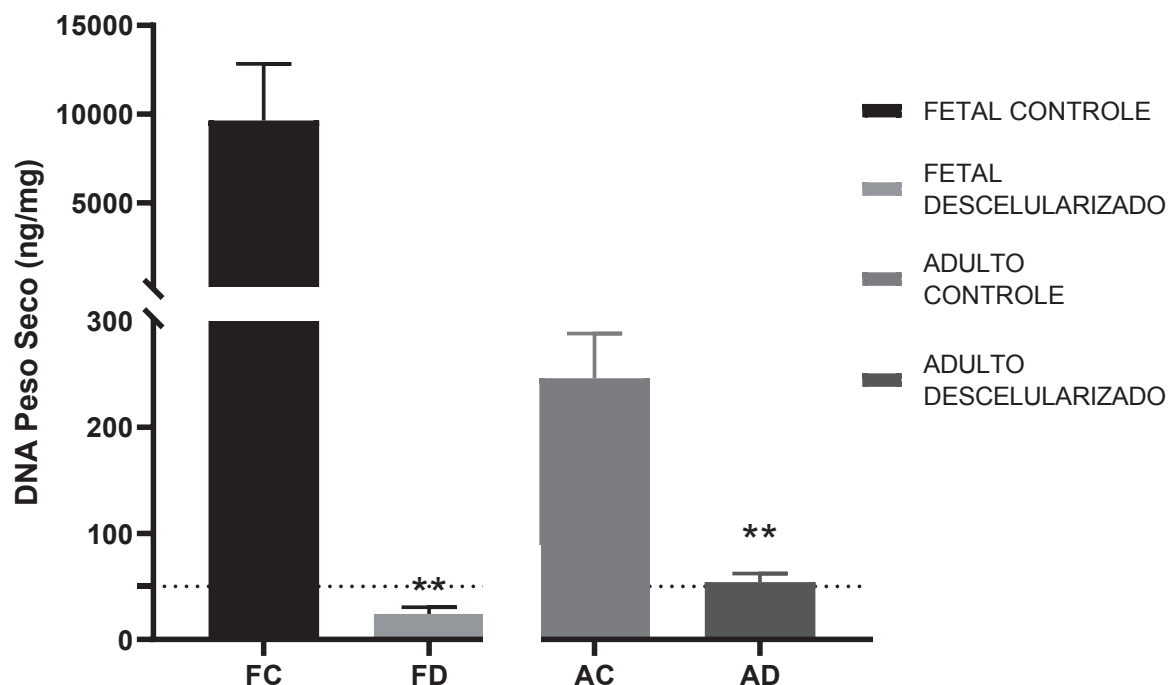
**Figura 1.** Blocos de ossos bovinos *in natura* (A). Bloco de osso bovino após a etapa de descélularização (B e C). Ossos moídos desmineralizados para a produção do hidrogel (C e D). Hidrogel derivado da MEC do osso (F e G). As figuras B, D e F representam amostras de origem adulta e as figuras C, E e G representam amostras de origem fetal.



**Figura 2.** Osso descelularizado adulto (A) e Fetal (B) observado na lupa. Aumento 10x. Barra de escala: 2mm

### 5.1.1 Quantificação de DNA

De acordo com a literatura, a quantificação de DNA residual é considerada o padrão ouro para confirmação de descelularização. Nesse estudo, foi realizada a quantificação de DNA do osso descelularizado em comparação com não-descelularizado (Figura 1) e também do hidrogel adulto e fetal (Figura 3) para avaliação da eficiência do processo de remoção de células.



**Figura 3.** Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco dos diferentes grupos. Fetal Controle (FC, n=8), Fetal Descelularizado (FD, n=8), Adulto Controle (AC, n=8), Adulto Descelularizado (AD, n=8). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\*\* $p < 0,01$  descelularizados vs respectivos controles; Teste  $t$  não pareado).

Com base nos resultados, é possível afirmar que o protocolo de descelularização utilizado obteve sucesso ao promover uma queda significativa na quantidade de DNA e conseqüentemente de células no tecido ósseo. Quando se compara os valores de DNA das amostras fetais controle (FC = 9650,95 ng/mg  $\pm$  9010 n=8) e descelularizadas (FD =24,23 ng/mg  $\pm$  17,27 n=8), verifica-se uma redução significativa ( $p = 0,0091$ ) de aproximadamente de 99,75% de DNA para o tecido fetal.

Já nas amostras de osso adulto, quando se compara os valores de DNA controle (AC = 246,22 ng/mg  $\pm$  119,08 n=8) e descelularizados (AD= 54 ng/mg  $\pm$  22,91 n=8) obtém-se uma redução significativa ( $p=0,0005$ ) de aproximadamente 78%.

O tecido ósseo adulto possui maior porosidade e maior nível de mineralização quando comparados ao tecido ósseo fetal (QUELCH et al., 1983; WHITE, et al., 1991). No processo de descelularização, essa característica pode ter influenciado na ação do detergente para remoção das células.

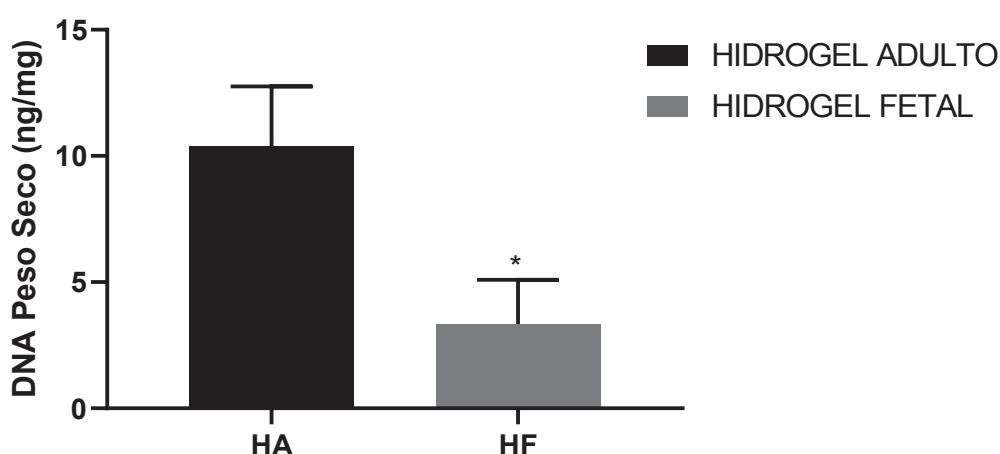
O tecido nativo adulto (AC) apresentou menor conteúdo de DNA do que o nativo fetal (FC), isso pode estar relacionado com o tipo de amostra coletada do osso adulto, pois sendo mais compacto e mineralizado, pode apresentar menor conteúdo orgânico, sangue e células, do que o osso fetal (LEI et al., 2015).

Esses valores são muito semelhantes aos encontrados no estudo de Barros (2018). A principal diferença está na concentração do detergente SDS utilizado para descelularizar o tecido adulto ósseo adulto. O presente estudo utilizou uma concentração quatro vezes maior comparado com o estudo de Barros, que pode ter sido mais eficiente para remoção de células. Além disso, nesse estudo foram incluídas lavagens desengordurantes de Metanol e Clorofórmio que podem ter ajudado na remoção de células adiposas.

Inicialmente, foi estabelecido que os tecidos descelularizados não deveriam apresentar quantidade de DNA superior a 50 ng/mg de tecido seco (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011). Os resultados obtidos para o tecido ósseo fetal descelularizado se mostrou satisfatório a medida em que se encaixa no padrão estabelecido por Crapo, Gilbert e Badylak (2011). Já o tecido ósseo adulto descelularizado apresentou resultados um pouco superior ao recomendado por Crapo, Gilbert e Badylak (2011), com uma média de 54 ng/mg de DNA por tecido seco.

No entanto, alguns outros estudos relacionados a descelularização de tecidos para utilização em hidrogéis de MEC não utilizaram o parâmetro descrito por Crapo, Gilbert e Badylak (2011) e expressaram seus achados com base na porcentagem de descelularização em comparação com o tecido nativo (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019; RAVICHANDRAN et al., 2021.). No estudo de Fernández-Pérez e Ahearne (2019), o valor encontrado foi de cerca de 80% de remoção de DNA em comparação com tecido nativo, valor esse muito próximo ao encontrado nesse estudo, que foi de 78%.

Ao analisar a quantidade de DNA residual presente nos hidrogéis, observa-se o mesmo padrão daquele encontrado no tecido: a amostra fetal apresentando menor quantidade de DNA comparado com a amostra adulta (Figura 4).

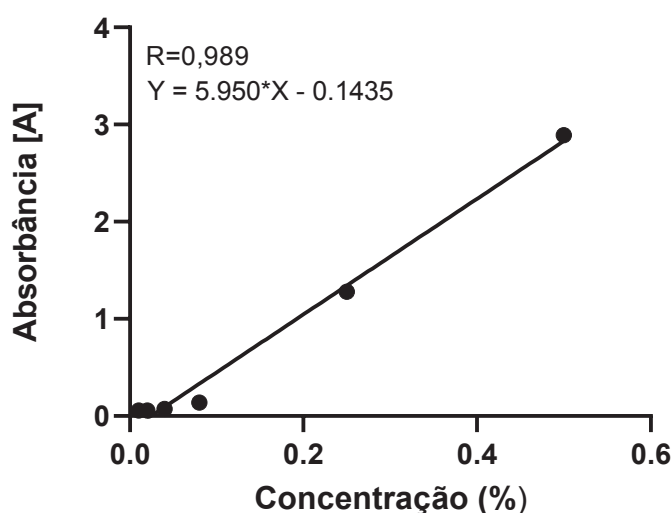


**Figura 4.** Concentração de DNA em ng/mg de material seco dos diferentes grupos. Hidrogel adulto (HA, n=4) e Hidrogel Fetal (HF, n=4). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\* $p < 0,01$  adulto vs fetal; Teste  $t$  não pareado).

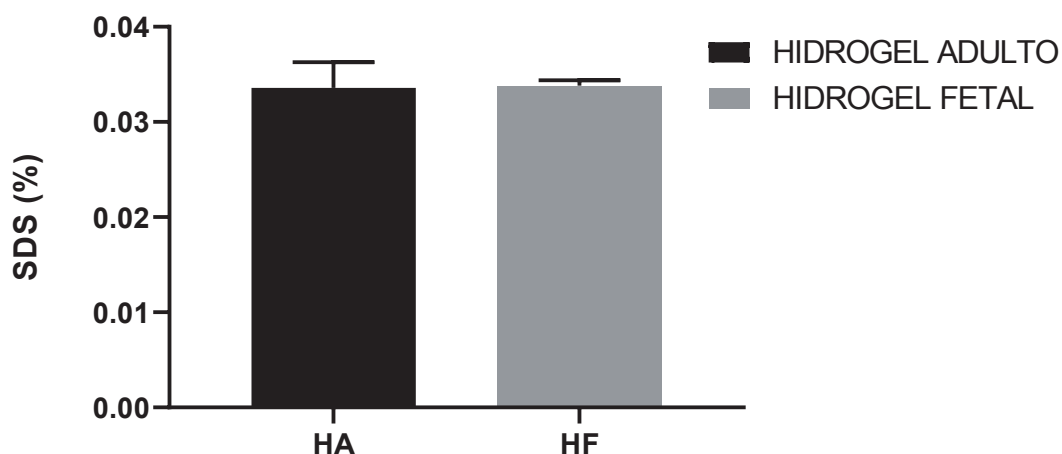
Após o processo de desmineralização do tecido e posterior lavagem e digestão, a quantidade de DNA nos hidrogéis diminuíram ainda mais. O hidrogel de origem fetal (HF=3,34 ng/mg  $\pm$  1,75) apresentou aproximadamente três vezes menos DNA do que o de origem adulta (HA=10,37 ng/mg  $\pm$  2,38 n =4). É comum que os processos pós-descelularização para produção do hidrogel diminua a quantidade de DNA e se encontrem em uma faixa menor que 50 ng/mg (FU et al., 2016).

### 5.1.2 Determinação de SDS residual

A partir da curva padrão confeccionada com concentrações de SDS entre 0,01% e 0,5% ( $R=0,989$ ) (Figura 5), foram mensurados o teor remanescente de detergente em amostras de hidrogel de origem adulta e fetal (Figura 6).



**Figura 5.** Curva padrão de SDS confeccionada com concentrações entre 0,25% e 0,01%.  $R=0,989$ .



**Figura 6.** Detergente residual em amostras de hidrogel de origem adulta (HA,  $n=4$ ) e de origem fetal (HF,  $n=4$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

Os resultados obtidos, não demonstraram diferença significativa entre o hidrogel adulto ( $HA= 0,0335\% \pm 0,0027$ ;  $n=4$ ) e o fetal ( $HF=0,0338\% \pm 0,0005$   $n=4$ ).

Apesar da eficiência para remoção de células, sabe-se que o SDS é um detergente citotóxico, responsável por baixos níveis de crescimento celular em tecidos

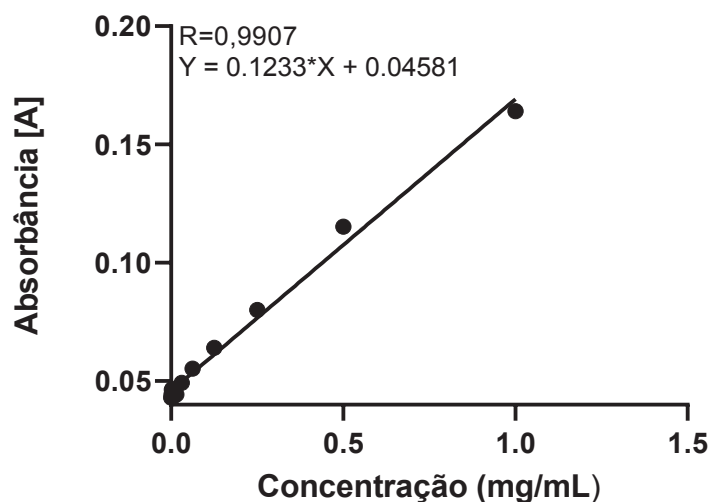


descelularizados (GRATZER; HARRISON.; WOODS, 2006; FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019). Os ensaios utilizando células nos hidrogéis e a possível interferência do SDS residual será discutido no tópico 5.5.2.

### 5.1.3 Análise Quantitativa de Colágeno

O teor de hidroxiprolina é usado como parâmetro para estabelecer a quantidade de colágeno em tecidos. A literatura utiliza a relação que o aminoácido hidroxiprolina forma 14,3% do colágeno total no tecido ósseo (SAWKINS et al., 2013).

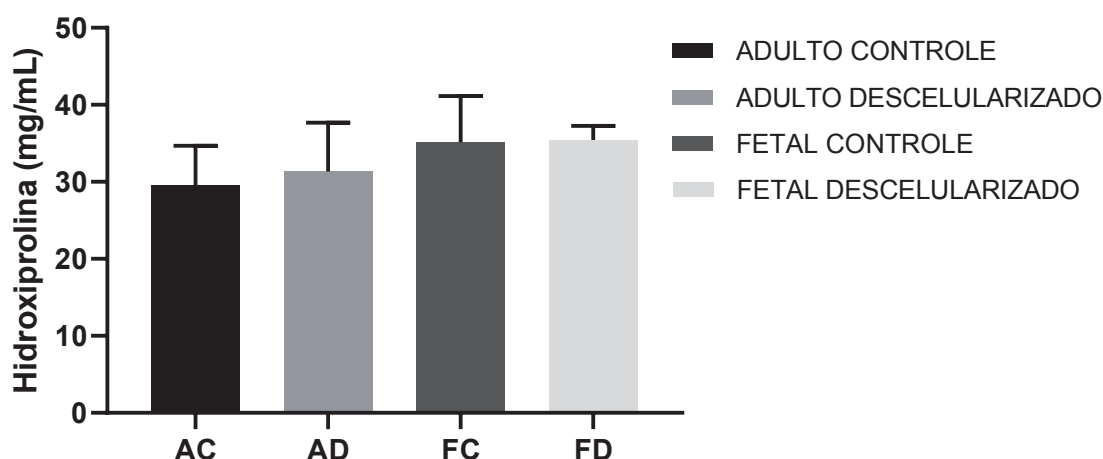
A quantidade de hidroxiprolina presente nas amostras foi mensurado a partir da curva padrão confeccionada com concentrações de hidroxiprolina entre 1 e 0,00048 mg/mL ( $R=0,9907$ ) (Figura 7).



**Figura 7.** Curva padrão de hidroxiprolina confeccionada com concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL.

Os resultados da concentração de hidroxiprolina nos ossos não descclularizados (controle), descclularizados estão demonstrados na Figura 8.





**Figura 8.** Concentração de hidroxiprolina por mL de tecido digerido. Adulto Controle (AC n=4), Fetal Controle (FC, n=4), Adulto Descelularizado (AD, n=4), Fetal Descelularizado (FD, n=4). Os dados estão expressos em média ± EPM; Teste *t* não pareado.

Com base nos resultados de amostras controles (AC 29,51 ± 5,17 n=4; FC 35,14 ± 6 n=4) e descelularizadas (AD = 31,3 mg/mL ± 6,35 n=4; FD=35,4 mg/mL ± 1,83 n=4), é possível afirmar que o processo de descelularização manteve as concentrações de hidroxiprolina tanto para o osso adulto ( $p= 0,6731$ ), quanto para o osso fetal ( $p= 0,9291$ ).

O colágeno é um componente essencial da MEC óssea e desempenha um importante papel na formação óssea. Pesquisas sugerem que o colágeno promove a proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais ósseas e induz a osteogênese. O colágeno mineralizado também tem um papel único na aceleração da regeneração óssea (LI, et al., 2021).

De acordo com Friedrich et al. (2017), quanto maior a concentração de detergente utilizada no processo de descelularização, maior é a probabilidade de remover moléculas importantes de matriz, como colágeno, glicoproteínas, e principalmente glicosaminoglicanos. Os resultados desse estudo sugerem que a concentração de detergente utilizada para descelularização, tanto do osso adulto quanto do osso fetal, não comprometeu, de maneira significativa, o conteúdo de colágeno presente na matriz extracelular.

Além disso, também não houve diferença significativa entre a quantidade de hidroxiprolina no osso fetal e adulto ( $p=0,2616$ ). Tal resultado corrobora com o estudo

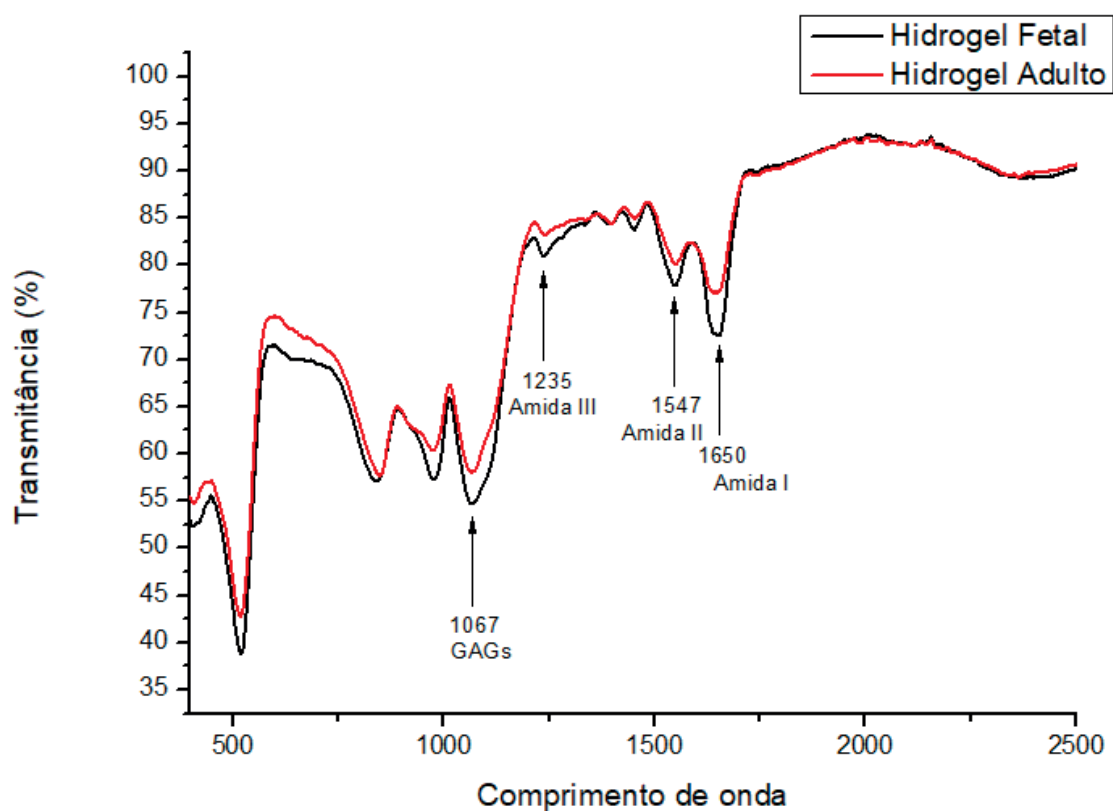
de Field et al. (1974), pois ao analisar a porcentagem de hidroxiprolina em matéria seca e sem gordura de ossos bovinos jovens (2-5 meses) e adultos (48-96 meses), também não foi demonstrado diferença significativa entre eles.

Os hidrogéis derivados de MEC são reticuladas pela molécula de colágeno para formar uma rede tridimensional. Quanto maior a quantidade desse polímero, maior será o grau de reticulação e mais rígido ficará o hidrogel. Sabe-se que a rigidez do hidrogel influencia na quantidade e qualidade das células, podendo afetar a proliferação, viabilidade e diferenciação celular (LV et al., 2008; TAN et al., 2014). Esses resultados sugerem que a quantidade de colágeno presente em amostras fetais e adultas são semelhantes e, portanto, não devem se diferenciar em relação a sua rigidez.

## 5.2 ANALISE POR INFRAVERMELHO (FTIR)

Para caracterizar quimicamente o hidrogel de origem adulta e fetal, utilizou-se a análise por infravermelho. Como mostrado na Figura 9, os dados espectrais do hidrogel adulto e fetal não demonstraram diferença em relação aos picos encontrados. Os resultados sugerem que os hidrogéis são compostos por proteínas formadoras do colágeno. A análise de FTIR mostrou bandas de amida típicas em 1650, 1547 e 1235  $\text{cm}^{-1}$ , indicando alongamento C=O (Amida I), deformação N-H (Amida II) e deformação N (Amida III), respectivamente (AHN, et al., 2017; PAVIA, et al., 2010). Essas bandas mostram a conformação do esqueleto proteico (RYGULA et al., 2013).

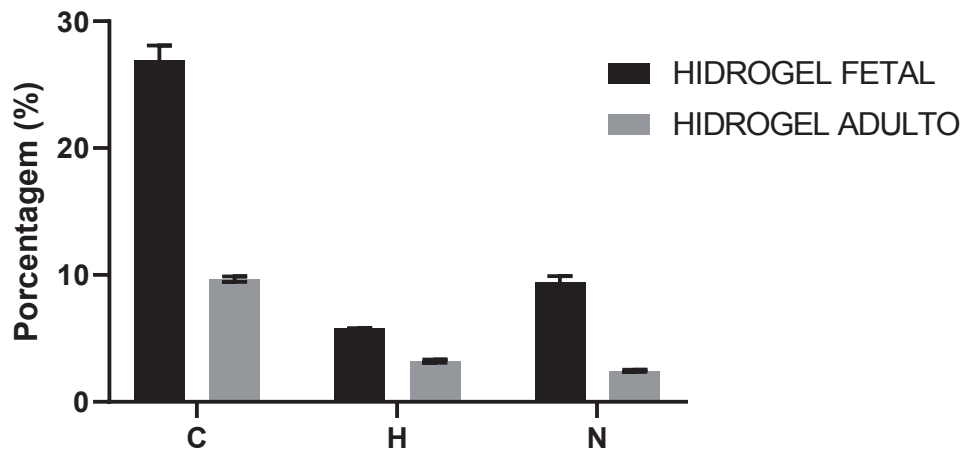
Tanto o sulfato de condroitina quanto o sulfato de heparina contêm bandas na faixa de 1000  $\text{cm}^{-1}$  a 1300  $\text{cm}^{-1}$ , indicativos de trecho S=O e R-SO<sub>3</sub>. Dessa forma, nas amostras de hidrogel adulto e fetal foi encontrado um pico em 1067  $\text{cm}^{-1}$ , que pode indicar a presença de glicoadinoglicanos (GAGs) (SEIF-NARAGHI, et al. 2012; PAVIA, et al., 2010).



**Figura 9.** Análise de infravermelho evidenciando o espectro do hidrogel de origem fetal (linha preta) e o hidrogel de origem adulta (linha vermelha) de maneira comparativa e representativa.

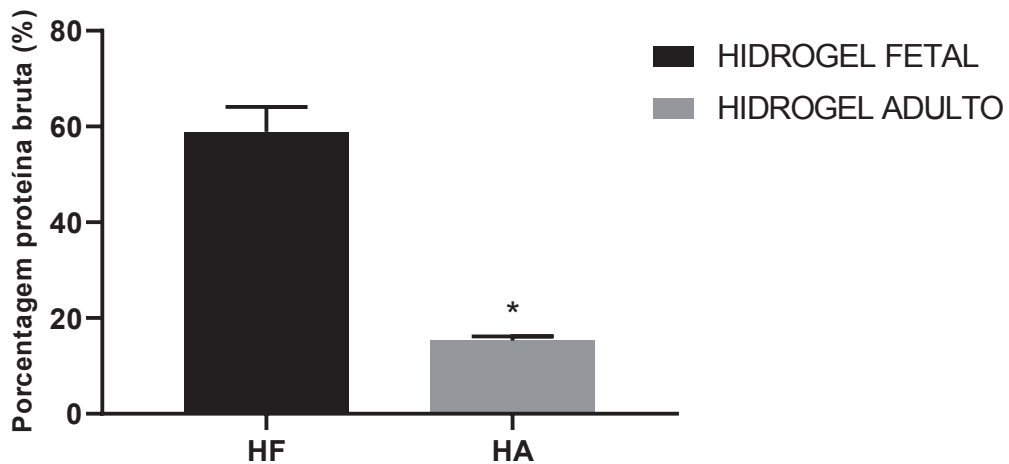
### 5.3 ANALISE ELEMENTAR (CHN)

Para identificação e determinação da composição das amostras de hidrogel adulto e fetal foi utilizado a análise elementar de CHN, que determina os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio (Figura 10).



**Figura 10.** Análise elementar do hidrogel fetal (preto) e adulto (cinza) referente aos elementos carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM.

O nitrogênio total da análise CHN pode ser convertido em proteína bruta utilizando o fator tradicional proposto por Jones (1931) (LOURENÇO et al., 2002; JONES, 1931). Dessa forma, a inferência da porcentagem de proteína bruta no hidrogel adulto e fetal foi determinada usando  $\%N \times 6.25$  (Figura 11).



**Figura 11.** Inferência da porcentagem de proteína bruta no hidrogel adulto (HA) e no hidrogel fetal (HF). Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\* $p < 0,0001$  fetal vs adulto; Teste  $t$  Student).

Com base nos resultados, o hidrogel fetal (HF= 58,9%  $\pm$  5,14) apresentou uma diferença significativa em relação a porcentagem de proteína bruta em comparação com o hidrogel adulto (HA =15,28%  $\pm$  0,88) ( $p < 0,0001$ ).

A quantidade de matriz orgânica presente no osso fetal é superior comparado ao adulto (QUELCH et al., 1983; WHITE, et al., 1991). Logo, o osso adulto tem uma quantidade maior de matriz mineralizada quando comparado com o osso fetal. Essa matriz mineralizada é composta principalmente por cristais de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (UNAL; CREECY; NYMAN, 2018).

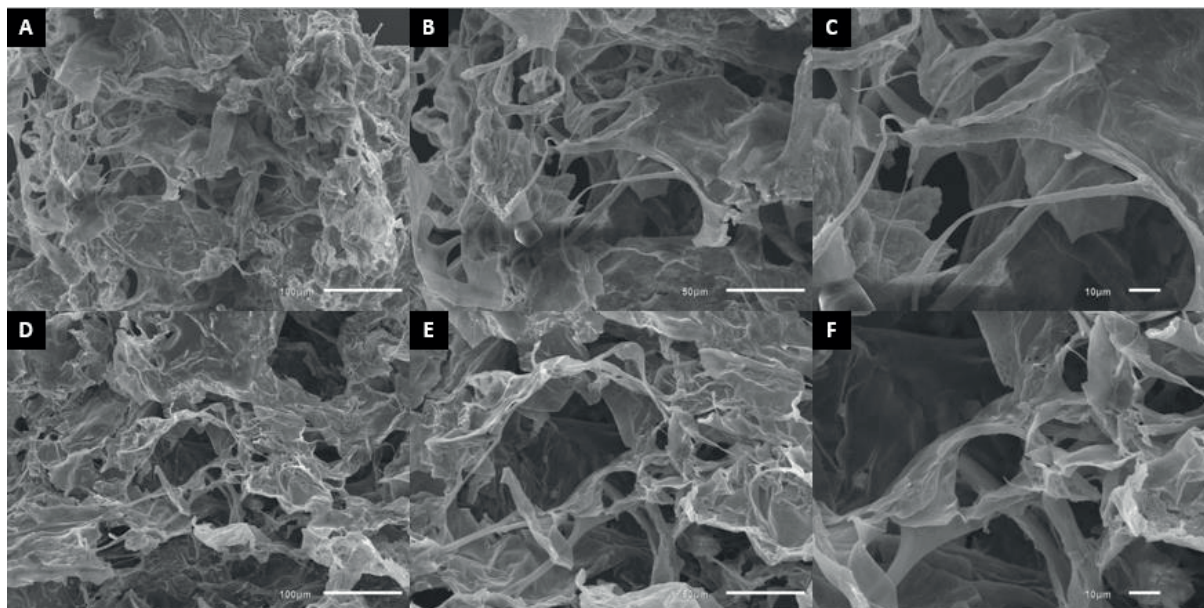
Dessa forma, é esperado que a porcentagem de proteína bruta seja maior no hidrogel fetal quando comparado ao hidrogel adulto, já que o osso adulto possui uma maior porcentagem de compostos inorgânicos, como Cálcio e Fósforo em sua matriz, quando comparado ao osso fetal.

Esse estudo corrobora com o estudo de Quelch et al. (1983), no qual também foi encontrado uma maior quantidade de proteína (mg/g de osso) no osso de um neonato quando comparado a um osso de origem adulta.

Esse resultado pode influenciar no processo de diferenciação celular, visto que os elementos orgânicos do osso podem exibir maior efeitos de diferenciação do que os elementos inorgânicos (AN, et al., 2015).

#### 5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação da microarquitetura dos hidrogéis derivados de MEC de osso bovino adulto e fetal e está demonstrada na Figura 12.



**Figura 12.** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos hidrogéis de MEC de osso adulto (A, B e C) e de osso fetal (D, E e F). Barra de escala: A e D: 100  $\mu\text{m}$ , B e E: 50  $\mu\text{m}$  e C e F: 10  $\mu\text{m}$ . Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente.

A partir dessas imagens, é possível a visualização do arcabouço proteico dos hidrogéis contendo principalmente proteínas colágenas para formar uma rede tridimensional.

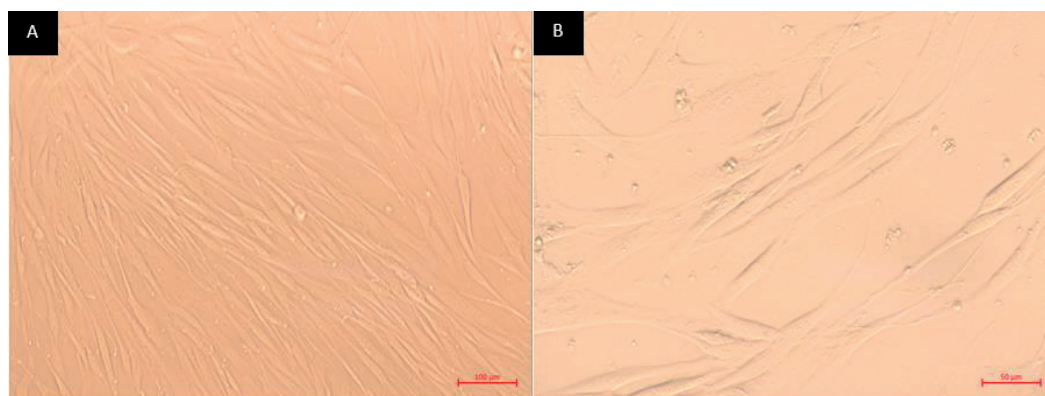
Muitos estudos utilizam o método de criofratura e desidratação seriada com etanol para visualização das fibras colágenas no interior do hidrogel (SAWKINS et al., 2013; FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019; ASTON, et al., 2016). Esse método tem potencial para oferecer insights mais autênticos sobre a estrutura nativa dos hidrogéis (ASTON, et al., 2016). Porém, não foi possível a realização desse método no hidrogel desenvolvido nesse estudo por conta da sua baixa viscosidade.

As imagens obtidas nesse estudo são semelhantes ao encontrado no estudo de Amaral (2018), que também preparou um hidrogel a partir de MEC de osso bovino e realizou as imagens utilizando o hidrogel liofilizado para visualização da microarquitetura do hidrogel.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS HIDROGEIS

### 5.5.1 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais (CTM's)

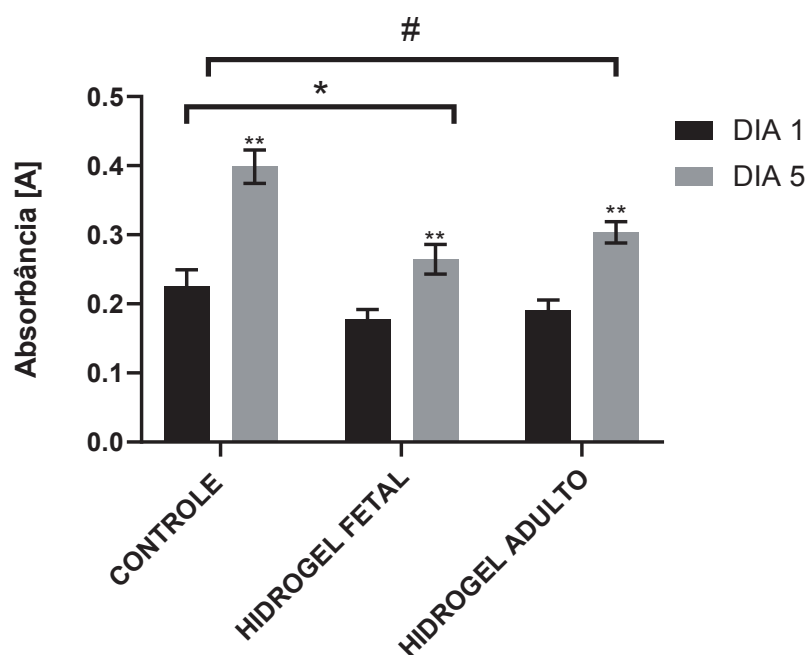
As CTM's apresentaram uma morfologia típica fibroblastóide, na qual as células são alongadas e fusiformes, conforme descrito por Motaln e Schichor (2010) (Figura 13).



**Figura 13.** Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 100 µm, B: 50 µm. Aumento de 100x e 200x, respectivamente.

### 5.5.2 Avaliação Da Proliferação e Viabilidade Celular

O ensaio de proliferação e viabilidade celular é uma avaliação básica e essencial realizada para determinar a biocompatibilidade de materiais usados na biomedicina (CAPELLA et al., 2019). Para essa avaliação foi utilizado o ensaio de MTT. Nesse ensaio, as CTM's foram cultivadas apenas com meio suplementado, que foi utilizado como controle, e com os hidrogéis de origem adulta e fetal. Esse ensaio foi feito em dois tempos: 1 e 5 dias após a exposição das células com o biomaterial. A absorbância é diretamente proporcional à proliferação celular (Figura 14).



**Figura 14.** Avaliação da proliferação celular por MTT do controle (n=7), hidrogel fetal (n=7) e hidrogel adulto (n=7) após 1 e 5 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM; (\*\* $p < 0,01$  dia 1 vs dia 5 dos respectivos ensaios. Teste  $t$  de Student; \* $p < 0,0001$



controle vs hidrogel fetal; #  $p < 0,001$  controle vs hidrogel adulto; 2-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey).

Entre o 1° e o 5° dia de cultivo das CTM's houve proliferação celular em todos os ensaios feitos (\*\* $p < 0,01$ ). Esse resultado sugere que as células presentes nos hidrogéis e no controle se adequaram ao meio e obtiveram uma proliferação significativa.

Após 24 horas de exposição não houve diferença estatística em relação a proliferação do controle com os hidrogéis ( $p > 0,1$ ), e a viabilidade celular para ambos os hidrogéis se deu em torno de 80%.

Porém, depois de 5 dias de exposição das células ao biomaterial, foi encontrada diferença estatística entre a proliferação do controle ( $0,39 \pm 0,06$ ;  $n=7$ ) com o hidrogel adulto ( $0,30 \pm 0,03$ ;  $n=7$ ) (#  $p < 0,0069$ ) com o hidrogel fetal ( $0,26 \pm 0,04$ ;  $n=7$ ) (\* $p < 0,0001$ ). Não foi demonstrada diferença estatística entre a proliferação do hidrogel adulto em relação ao fetal ( $p=0,38$ ). Em relação a viabilidade celular calculada, foi encontrada 76% de viabilidade para o hidrogel adulto e 66% para o hidrogel fetal.

Hidrogéis de MEC já demonstraram boa biocompatibilidade com células humanas e animais. Sawkins et al. (2013) demonstraram que hidrogel de MEC óssea promoveu a proliferação de células da calvária de camundongos quando comparados a hidrogel de colágeno do tipo I. Além disso, Paduano et al. (2017) demonstrou que seu hidrogel derivado de MEC óssea mantinha a viabilidade celular quase que em 100% nas CTM's derivadas de polpa dentária.

Um dos fatores que poderia estar influenciando na viabilidade dos hidrogéis após 5 dias seria a presença de SDS residual nas amostras, visto que esse detergente é considerado citotóxico para as células (GRATZER; HARRISON; WOODS, 2006; (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019).

O estudo de Zvarova et al. (2016) avaliou o impacto da concentração de SDS residual em diferentes tipos celulares e observou que existe um limiar de concentração diferente para cada tipo de célula. Nas CTM's humanas, o limiar citotóxico encontrado foi de 0,002%, mais de dez vezes maior do que o encontrado nesse estudo (0,03%). Logo, esse resultado sugere que o SDS residual presente nas amostras de hidrogel, tanto fetal quanto adulto, pode estar influenciando na proliferação celular.



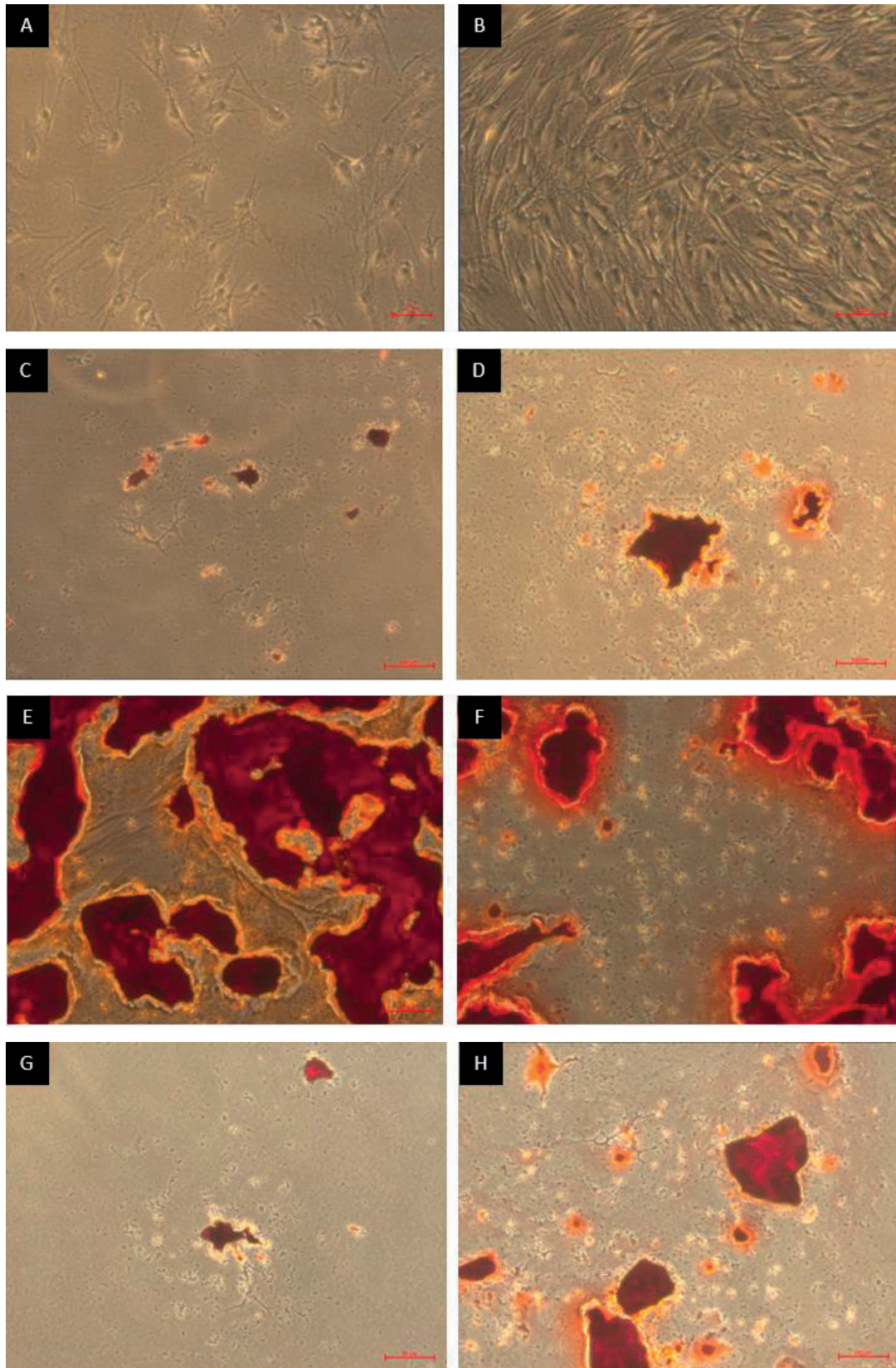
Apesar da viabilidade celular encontrada para o quinto dia não ser considerada alta (>85%) (ROUILLARD et al., 2011; WÜST et al., 2014), KIM et al. (2007) testaram hidrogel em CTM's humanas e encontrou uma viabilidade em torno de 70% e os testes *in vivo* em defeitos ósseos em ratos não demonstraram nenhuma resposta inflamatória. Isso sugere que há necessidade de mais estudos que relacionem com maior nível de precisão a porcentagem de viabilidade celular adequada e estudos *in vitro* e os efeitos *in vivo* em *scaffolds* para uso na bioengenharia tecidual.

#### 5.6 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA NOS HIDROGÉIS

Para avaliar o potencial da diferenciação osteogênica nos hidrogéis, foi feita a coloração com vermelho de alizarina seguida da análise quantitativa de cálcio. Para esse ensaio, CTM's com e sem hidrogéis de origem adulta e fetal foram cultivados com e sem o meio osteogênico.

Durante o processo de diferenciação osteogênica, as células começam a se diferenciar em células ósseas e depositam proteínas e cálcio na MEC. A coloração com vermelho de alizarina irá corar justamente esses depósitos de cálcio (ALMEIDA et al., 2015).

As imagens obtidas da diferenciação osteogênica das células controle e nos hidrogéis corados com vermelho de alizarina estão mostradas na Figura 15.

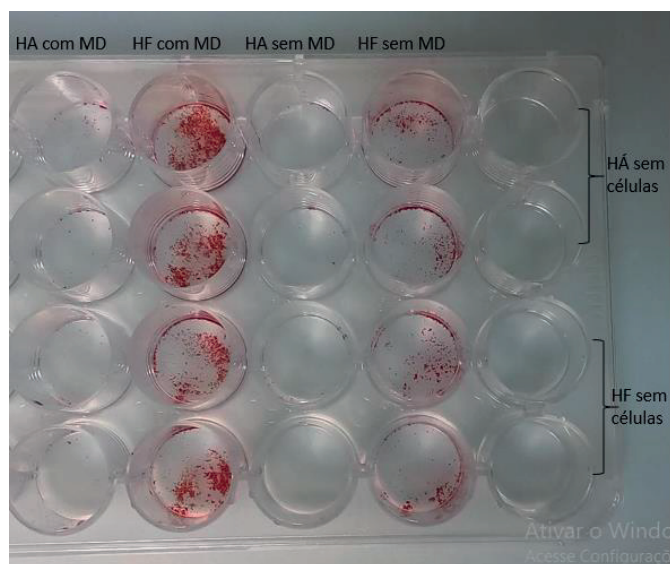


**Figura 15.** Imagens de microscopia da coloração com Vermelho de Alizarina evidenciando a diferenciação osteogênica. Células controle com (A) e sem (B) meio de diferenciação; Hidrogel Adulto (C e D) e Hidrogel Fetal (E e F) com meio indutor de diferenciação. Hidrogel Adulto (G) e Fetal (H) sem meio indutor de diferenciação. Todas as imagens foram obtidas com aumento de 100x. Barra de escala: A, C, D, E, F e H: 100 μm; B: 20 μm; G: 50 μm

As células controle (A) com meio de diferenciação apresentaram uma morfologia diferente das CTM's (B), não sendo fibroblastóide e apresentando morfologia espalhada, sugerindo serem células ósseas (SUN et al., 2018; ALMEIDA et al., 2015).

A coloração com Vermelho de Alizarina evidenciou os depósitos de cálcio das células diferenciadas no hidrogel adulto e fetal, tal como observado no estudo de Almeida et al. (2015). É possível observar a presença de alguns debris, que são fragmentos de corante que não foram removidos com as lavagens. Esse problema pode ser solucionado através da filtragem do corante em papel filtro e a adição de mais lavagens com água destilada.

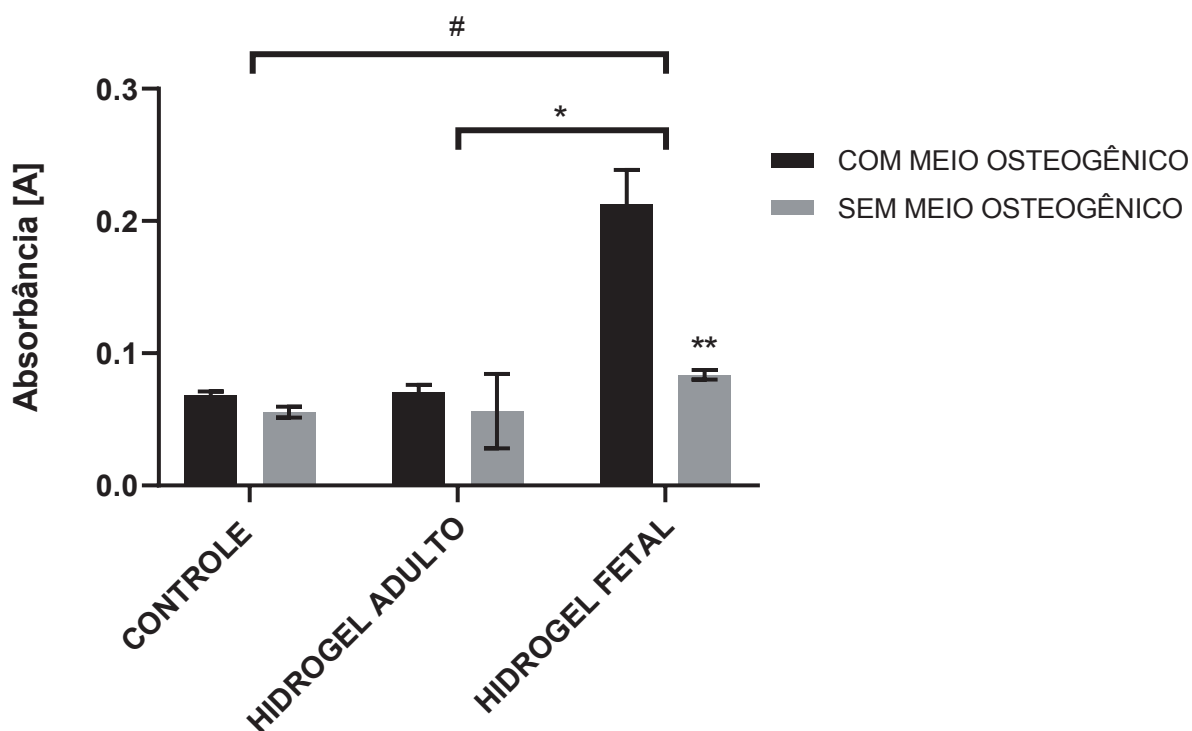
Não foi possível observar com muita clareza a presença de células nos hidrogéis. Isso provavelmente se deve ao próprio processo de coloração que retirou o hidrogel, podendo ter removido também as células. Porém, o cálcio depositado por essas células permaneceu e foi evidenciado pela coloração, sugerindo que haviam células ali. Para a confirmação que os depósitos de cálcio foram produzidos pelas células e não são resquícios minerais do próprio hidrogel, foi feito um controle dos hidrogéis sem células e não houve coloração (Figura 16).



**Figura 16.** Coloração com Vermelho de Alizarina observado na placa de plástico para cultura. HA com MD: Hidrogel Adulto com meio de diferenciação osteogênico; HF com MD: Hidrogel Fetal com meio de diferenciação osteogênico; HÁ sem MD: Hidrogel Adulto sem meio de diferenciação osteogênico; HF sem MD: Hidrogel Fetal sem meio de diferenciação osteogênico; HÁ sem células: Hidrogel Adulto sem células; HF sem células: Hidrogel Fetal sem células.

De acordo com a Figura 14, pode-se observar que a coloração com Vermelho de Alizarina no hidrogel fetal com (E e F) e sem meio indutor de diferenciação (H) se

mostrou com um número maior de depósitos de cálcio comparado com o hidrogel adulto (C e D). Para quantificar esses depósitos e avaliar o potencial de indução de diferenciação osteogênica foi feita a análise quantitativa de cálcio (Figura 17).



**Figura 17.** Quantificação de cálcio com e sem meio indutor de diferenciação das amostras controle, hidrogel adulto e hidrogel fetal (\*\* $p < 0,005$  hidrogel fetal sem meio osteogênico vs hidrogel fetal com meio osteogênico. Teste t de student; #  $p < 0,001$  controle vs hidrogel fetal; \*  $p < 0,001$  hidrogel fetal vs hidrogel adulto 2-way ANOVA pós-teste de Tukey).

Com base nos resultados, pode-se observar que a quantificação de cálcio com e sem meio osteogênico no hidrogel fetal foi maior quando comparado com controle ( $p = 0,0001$ ) e com o hidrogel adulto ( $p = 0,0001$ ). Esses resultados sugerem que o hidrogel fetal teve uma maior indução à diferenciação osteogênica quando comparado ao controle e ao hidrogel adulto.

Na análise de CHN realizada neste estudo, foi encontrado uma maior porcentagem de matéria orgânica para o hidrogel fetal em comparação com o hidrogel adulto. O estudo de An et al. (2015) avaliou a diferenciação osteogênica em biomateriais de origem orgânica e inorgânica e encontrou resultados significativamente maiores de marcadores osteogênicos, como fosfatase alcalina e osteocalcina, para biomateriais de origem orgânica. Esse estudo concluiu que os elementos orgânicos do osso podem exibir maior efeitos de diferenciação em células do que os elementos inorgânicos.



Dessa forma, neste estudo, pode ser que a maior quantidade de matéria orgânica presente no hidrogel fetal induziu mais a diferenciação osteogênica do que o hidrogel adulto que obteve quantidades menores de matéria orgânica.

Além disso, a matriz óssea fetal possui características que se diferenciam da matriz adulta. A osteonectina é uma das proteínas não colágenas mais abundantes na MEC óssea fetal e tem um importante papel no processo de mineralização óssea ao mediar a ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  e apatita ao colágeno tipo I (CONN; TERMINE, 1985). Esse e alguns outros componentes como fatores de crescimento, enzimas e outras proteínas que estão presentes na MEC óssea fetal podem estar influenciando no processo de diferenciação celular e sendo o motivo pelo qual observa-se um maior nível de mineralização óssea no hidrogel fetal do que no hidrogel adulto neste estudo.

Não há artigos na literatura que utilizam MEC óssea fetal para desenvolver biomateriais na engenharia de tecidos. O hidrogel derivado de MEC fetal desenvolvido nesse trabalho é inédito apresenta um grande potencial para estudos dentro da bioengenharia tecidual e pode ser um aliado na busca por biomateriais que promovam a regeneração óssea.

Os hidrogéis derivados de MEC óssea já demonstraram aumentar a porcentagem do volume ósseo e mineralização em modelos *in vivo* (GOTHARD et al., 2015). Isso sugere que a MEC preserva em sua composição fatores que estimulam a diferenciação osteogênica, tanto *in vitro* (PADUANO et al., 2016, ALOM et al., 2017) como *in vivo* (GOTHARD et al., 2015).

A análise quantitativa de cálcio a partir da coloração com vermelho de alizarina para avaliar a mineralização óssea já foi utilizada em diversos estudos (ALMEIDA et al., 2015; ABAGNALE et al., 2015; ZHANG et al., 2009) incluindo em estudos que utilizam *scaffolds* de hidrogel na engenharia de tecidos (XAVIER et al., 2015; FANG et al., 2016). Porém, diversos outros estudos que avaliam a diferenciação osteogênica em hidrogéis de MEC óssea, verificam também o nível de marcadores osteogênicos nas células (principalmente de sialoproteína óssea e osteocalcina) através de análise de citometria de fluxo ou PCR em tempo real (AMARAL et al., 2020; SPANG; CHRISTMAN, 2018; PADUANO et al., 2017). Essas análises confirmam com maior nível de precisão a quantidade de marcadores que estão sendo expressadas pelas células e assim avaliam o nível de diferenciação celular. Sendo assim, a utilização de

marcadores osteogênicos poderia enriquecer e complementar os resultados obtidos neste trabalho.

As análises realizadas neste estudo focaram na avaliação do potencial biológico dos hidrogéis, isto é, sua biocompatibilidade e capacidade de diferenciação *in vitro*. Porém, o grande desafio da busca de biomateriais compatíveis para aplicação na bioengenharia de tecidos, envolvem características além da biocompatibilidade e capacidade de diferenciação *in vitro*, como boas propriedades mecânicas. Sabe-se que as características mecânicas de um biomaterial influenciam o comportamento celular, como sua proliferação, viabilidade e diferenciação (TAN et al., 2014).

Estudos que desenvolvem hidrogéis também avaliam a reologia, viscosidade e a cinética de gelificação turbidimétrica (SAWKINS et al., 2013; PADUANO et al., 2017 MASSENSINI et al., 2015). Dessa forma, como complementação desse estudo, sugere-se a realização de ensaios que avaliem as propriedades mecânicas desses hidrogéis para melhor compreensão de sua aplicabilidade na bioengenharia de tecidos.

## 7 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi produzido com sucesso um hidrogel a partir de MEC óssea de origem bovina adulta e fetal. O processo de descelularização se mostrou efetivo com redução de cerca de 99% de DNA para o osso fetal e 78% para o osso adulto. Além disso, o processo utilizado parece ter preservado os componentes de MEC, principalmente o colágeno.

O biomaterial desenvolvido nesse trabalho apresentou biocompatibilidade *in vitro* demonstrando proliferação celular em todos os ensaios feitos. Os resultados que avaliaram a diferenciação óssea sugeriram um maior nível de diferenciação osteogênica em CTM's do hidrogel fetal em comparação como o hidrogel adulto. Isso provavelmente teve relação com a quantidade de matriz orgânica e outros componentes como enzimas e fatores de crescimento presentes na MEC fetal.

O hidrogel de origem fetal desenvolvido nesse trabalho é inédito e apresentou um grande potencial para a bioengenharia tecidual e pode ser um aliado na busca por biomateriais que promovam a regeneração óssea. Porém, são necessários mais estudos para confirmar o que foi descoberto e discutido neste trabalho.

Além disso, o presente estudo focou na avaliação biológica dos hidrogéis, através de análises bioquímicas e ensaios de proliferação e diferenciação *in vitro*, é sugerido avaliar também suas propriedades mecânicas, pois sabe-se que ela tem grande influência sobre o comportamento celular. Dessa forma, o conjunto dessas análises poderá contribuir de maneira significativa na descoberta de biomateriais aplicáveis na bioengenharia de tecidos ósseos para o reparo ósseo.

## 8 PERSPECTIVAS

Os hidrogéis desenvolvidos neste trabalho, em especial o hidrogel fetal, demonstraram potencial para estudos em modelos *in vivo* visando possíveis aplicações em seres humanos para o reparo ósseo. Porém para serem realizados testes em seres vivos é necessário primeiro: reduzir a quantidade de SDS residual a partir de lavagens após a descelularização para avaliar se há diminuição da citotoxicidade celular nos hidrogéis; avaliar a diferenciação osteogênica a partir de análise de marcadores osteogênicos e avaliar as propriedades mecânicas do hidrogel a partir de análise de sua reometria e viscosidade.



## 9 REFERÊNCIAS

ABAGNALE, Giulio et al. Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages. **Biomaterials**, v. 61, p. 316-326, 2015.

AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advanced research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

AHN, Geunseon et al. Precise stacking of decellularized extracellular matrix based 3D cell-laden constructs by a 3D cell printing system equipped with heating modules. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 8624, 2017.

ALMEIDA, Paula Nascimento et al. Proposing the use of dental pulp stem cells as a suitable biological model of neurofibromatosis type 1. **Child's Nervous System**, v. 31, p. 7-13, 2015.

AMARAL, Danielle LAS et al. In vitro evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. **Biomedical Materials**, v. 14, n. 3, p. 035011, 2019.

AN, Shaofeng et al. A comparative study of the proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells cultured on  $\beta$ -TCP ceramics and demineralized bone matrix with or without osteogenic inducers in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, n. 5, p. 1341-1346, 2015.

ASTON, Robyn et al. Evaluation of the impact of freezing preparation techniques on the characterisation of alginate hydrogels by cryo-SEM. **European Polymer Journal**, v. 82, p. 1-15, 2016.

BAI, Xin et al. Bioactive hydrogels for bone regeneration. **Bioactive materials**, v. 3, n. 4, p. 401-417, 2018.

BULLARD, Kelli M.; LONGAKER, Michael T.; LORENZ, H. Peter. Fetal wound healing: current biology. **World journal of surgery**, v. 27, n. 1, p. 54-61, 2003.

CANCEDDA, Ranieri et al. Cartilage and bone extracellular matrix. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 12, p. 1334-1348, 2009.

CAPELLA, Virginia et al. Cytotoxicity and bioadhesive properties of poly-N-isopropylacrylamide hydrogel. **Heliyon**, v. 5, n. 4, p. e01474, 2019.

CARVALHO, Marta S. et al. Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: Creating new bone by mimicking the extracellular matrix. **Polymers**, v. 13, n. 7, p. 1095, 2021.

CASTRO-SILVA, Igor Iúco. Enxertos ósseos na odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da gestão em saúde. **Revista Fluminense de Odontologia**, 2013.

CHAMPEAU, Mathilde et al. 4D printing of hydrogels: a review. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 31, p. 1910606, 2020.

CONN, K. M.; TERMINE, J. D. Matrix protein profiles in calf bone development. **Bone**, v. 6, n. 1, p. 33-36, 1985.

DO AMARAL, Danielle Luciana Aurora Soares. PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-IL-1 $\beta$ -scFab E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOBIOCOMPÓSITOS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE. 2018.

EDWARDS, C. A.; O'BRIEN, W. D. MODIFIED ASSAY FOR DETERMINATION OF HYDROXYPROLINE IN A TISSUE HYDROLYZATE. **Clinica Chimica Acta**, v. 104, p. 161–167, 1980.

FANG, Xingxing et al. Biomimetic gelatin methacrylamide hydrogel scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 6, p. 1070-1080, 2016.

FERGUSON, Cristin et al. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?. **Mechanisms of development**, v. 87, n. 1-2, p. 57-66, 1999.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, Julia; AHEARNE, Mark. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

FERNANDEZ-YAGUE, M. A. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1–29, 2015.

FIELD, Ray A. et al. Bone composition in cattle, pigs, sheep and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 493-499, 1974.

FRIEDRICH, Emily E. et al. Residual sodium dodecyl sulfate in decellularized muscle matrices leads to fibroblast activation in vitro and foreign body response in vivo. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 12, n. 3, p. e1704-e1715, 2018.

FU, Yuehe et al. Decellularization of porcine skeletal muscle extracellular matrix for the formulation of a matrix hydrogel: a preliminary study. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 20, n. 4, p. 740-749, 2016.

GORSKI, Jeffrey Paul. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 2598, 2011.

GRATZER, Paul F.; HARRISON, Robert D.; WOODS, Terence. Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix. **Tissue engineering**, v. 12, n. 10, p. 2975-2983, 2006.

GURTNER, Geoffrey C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, 2008.

HANOTTE, O.; BRUFORD, M. W.; BURKE, T. Multilocus DNA fingerprints in gallinaceous birds: general approach and problems. **Heredity**, v. 68, n. 6, p. 481-494, 1 jun. 1992.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C.; HUTMACHER, D. W. **Bone regeneration based on tissue engineering conceptions**—a 21st century perspective. *Bone research*, v. 1, n.3, p. 216-248, 2013

JONES, David Breese. **Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins**. US Department of Agriculture, 1931.

KIM, Jungju et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 10, p. 1830-1837, 2007.

LONGAKER, Michael T. et al. Midgestational excisional fetal lamb wounds contract in utero. **Journal of pediatric surgery**, v. 26, n. 8, p. 942-948, 1991.

LOURENÇO, Sergio O. et al. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, n. 3, p. 233-241, 2002.

LV, Qiang et al. Fibroin/collagen hybrid hydrogels with crosslinking method: preparation, properties, and cytocompatibility. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 84, n. 1, p. 198-207, 2008.

Ma X, He Z, Han F, Zhong Z, Chen L, Li B. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;143:81-7.

MAHALIA, Marion. **Development of alginate hydrogels for bone regeneration**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universitat Politècnica de Catalunya.

MASSENSINI, Andre R. et al. Concentration-dependent rheological properties of ECM hydrogel for intracerebral delivery to a stroke cavity. **Acta biomaterialia**, v. 27, p. 116-130, 2015.

MELLO JR, F. C.; FIELD, R. A.; RILEY, M. L. Effect of age and anatomical location on composition of bovine bone. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 3, p. 677-679, 1978.

MICLAU, Theodore et al. Common molecular mechanisms regulating fetal bone formation and adult fracture repair. **Bone regeneration and repair: biology and clinical applications**, p. 45-55, 2005.

MOTALN, Helena; SCHICHOR, Cristian; LAH, Tamara T. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 116, n. 11, p. 2519-2530, 2010.

NOBRE, Rita Maria Lages. **Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos**. 2016. Tese de Doutorado.

PADUANO, Francesco et al. Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration. **Journal of Biomaterials science, Polymer edition**, v. 28, n. 8, p. 730-748, 2017.

PAPADIMITROPOULOS, Adam et al. Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes. **Bone**, v. 70, p. 66-72, 2015.

PAVIA, Donald L. et al. Introdução à espectroscopia: Tradução da 4ª edição norteamericana. **São Paulo: Cengage Learning**, 2010.

QUELCH, Kaylene J. et al. Chemical composition of human bone. **Archives of oral biology**, v. 28, n. 8, p. 665-674, 1983.

RAVICHANDRAN, Akhilandeshwari et al. Photocrosslinkable liver extracellular matrix hydrogels for the generation of 3D liver microenvironment models. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 225-229, 1996.

ROUILLARD, Andrew D. et al. Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 2, p. 173-179, 2011.

RYGULA, A. et al. Raman spectroscopy of proteins: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 8, p. 1061-1076, 2013.

SAWKINS, Michael J. et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7865-7873, 2013.

SEIF-NARAGHI, Sonya B. et al. Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 10, p. 3695-3703, 2012.

SHOULDERS, Matthew D.; RAINES, Ronald T. Collagen structure and stability. **Annual review of biochemistry**, v. 78, p. 929, 2009.

SMITH, E. L. et al. Evaluation of skeletal tissue repair, part 1: assessment of novel growth-factor-releasing hydrogels in an ex vivo chick femur defect model. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4186-4196, 2014.

SPANG, Martin T.; CHRISTMAN, Karen L. Extracellular matrix hydrogel therapies: In vivo applications and development. **Acta biomaterialia**, v. 68, p. 1-14, 2018.

SUN, Meiyu et al. Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **International journal of medical sciences**, v. 15, n. 3, p. 257, 2018.

SWANSON, William W.; IOB, L. VIVIAN. Mineral composition of the bone and cartilage of the human fetus. **American Journal of Diseases of Children**, v. 54, n. 5, p. 1025-1029, 1937.

TAN, S.; FANG, J. Y.; YANG, Z.; NIMNI, M. E.; HAN, B. The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. **Biomaterials**, v. 35, n. 20, p. 5294-5306, 2014.

TERMINE, John D. et al. Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 20, p. 10403-10408, 1981.

THEOCHARIS, Achilleas D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.

UNAL, Mustafa; CREECY, Amy; NYMAN, Jeffry S. The role of matrix composition in the mechanical behavior of bone. **Current Osteoporosis Reports**, v. 16, p. 205-215, 2018.

WHITE, D. R. et al. The composition of body tissues.(II) Fetus to young adult. **The British journal of radiology**, v. 64, n. 758, p. 149-159, 1991.

WÜST, Silke et al. Tunable hydrogel composite with two-step processing in combination with innovative hardware upgrade for cell-based three-dimensional bioprinting. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 630-640, 2014.

XAVIER, Janet R. et al. Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: a growth-factor-free approach. **ACS nano**, v. 9, n. 3, p. 3109-3118, 2015.

YUE, Beatrice. Biology of the extracellular matrix: an overview. **Journal of glaucoma**, p. S20, 2014.

YUE, Shuai et al. Hydrogel as a biomaterial for bone tissue engineering: a review. **Nanomaterials**, v. 10, n. 8, p. 1511, 2020.

ZHANG, Qunzhou et al. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 12, p. 7787-7798, 2009.

ZUK, Patricia A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ZVAROVA, Barbora et al. Residual detergent detection method for nondestructive cytocompatibility evaluation of decellularized whole lung scaffolds. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 22, n. 5, p. 418-428, 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO  
SANTOCENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**THAIS LEAL RABELLO**

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE  
MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA ADULTA E  
FETAL**

VITÓRIA,ES

2023