



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AFFONSO MARTINHO BURINI BORTOLOTTI FAVALESSA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE BIOMATERIAL ÓSSEO FETAL
DESCELULARIZADO

VITÓRIA, ES

2023

AFFONSO MARTINHO BURINI BORTOLOTTI FAVALESSA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE BIOMATERIAL ÓSSEO FETAL
DESCELULARIZADO**

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

AFFONSO MARTINHO BURINI BORTOLOTTI FAVALESSA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE BIOMATERIAL ÓSSEO FETAL
DESCELULARIZADO**

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.

Avaliado em 14 de abril de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

F272a Favalessa, Affonso Martinho Burini Bortolotti, 1994-
AVALIAÇÃO DA CITOTOXIDADE DE BIOMATERIAL
ÓSSEO FETAL DESCELULARIZADO / Affonso Martinho
Burini Bortolotti Favalessa. - 2023.
49 f. : il.

Orientador: Breno Valentim Nogueira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Bioengenharia Tecidual. 2. Citotoxicidade. 3. Biomaterial
ósseo. 4. Células-tronco mesênquimais. I. Nogueira, Breno
Valentim. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



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

Ata da 217ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, do discente AFFONSO MATINHO BURINI BORTOLOTTI FAVALESSA, realizada às 13:00h do dia 14 de abril de 2023, na sala de webconferência do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação intitulada “AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE BIOMATERIAL ÓSSEO DESCELULARIZADO”. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio do link <https://meet.google.com/hgo-tneu-jeo>. 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, Universidade Federal do Espírito Santo - examinadora interna; Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba, Universidade Federal de Juiz de Fora - examinador externo, e passou a palavra para o aluno que apresentou a sua proposta de dissertação. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar o mestrando APROVADO na defesa de Mestrado. Eu, Breno Valentim Nogueira, que presidi a Banca de defesa, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Vitória, 14 de abril de 2023.

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - orientador
Universidade Federal do Espírito Santo

Profª. Drª. Flavia de Paula - examinadora interna
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba - examinador externo
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado digitalmente
CARLOS MAGNO DA COSTA MARANDUBA
Data: 12/05/2023 19:53:01-0300
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
FLAVIA DE PAULA - SIAPE 2441743
Departamento de Ciências Biológicas - DCB/CCHN
Em 18/05/2023 às 10:43

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/713421?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
BRENO VALENTIM NOGUEIRA - SIAPE 2499820
Departamento de Morfologia - DM/CCS
Em 18/05/2023 às 13:57

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/713642?tipoArquivo=O>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a espiritualidade amiga que me acompanha e me guia no caminho do bem.

Agradeço à minha família Rose, Afonso, Jacy, Luan, Luiza, vovó Jacyr pelo apoio e motivação, em especial ao meu vovô Cezar Bortolotti que desencarnou durante a pandemia.

Agradeço aos meus amigos, em especial Thais, Fernanda, Ezio, Leticia e Layana por tornarem essa jornada mais leve.

Agradeço principalmente ao meu orientador Professor Breno Valentim por ter me aceitado nessa equipe e ao Rodolpho que esteve me co-orientando, quero que saibam que vocês me ensinaram não só nas vivências no laboratório como também na vida.

Agradeço a todo pessoal do NBT.

À Universidade Federal do Espírito Santo pela educação pública e de qualidade.

À todos os professores envolvidos com minha formação, pela dedicação e por todo conhecimento.

Agradeço a Professora Flavia de Paula e sua equipe do NGHМ 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 Nº 01/2020 – SPIN OFF; T.O. Nº 105/2021) CAPES e ao ICEPI.

*“Qual é a coisa mais corajosa que você
já disse?” perguntou o menino.*

*“Socorro”, disse o cavalo. “Pedir ajuda não é
desistir”, disse o cavalo. ‘É se recusar a desistir’.*

Charlie Mackesy

RESUMO

A regeneração de defeitos ósseos de diferentes origens ainda se apresenta como um desafio nas áreas médica e odontológica. Atualmente, são utilizados inúmeros substitutos ósseos em procedimentos de enxertia decorrentes de lesões ou traumas. Contudo apenas alguns conseguem promover interações bioquímicas com o organismo, sendo os alvos das pesquisas em regeneração tecidual óssea. Diante disso, a bioengenharia de tecidos é responsável por avaliar a capacidade de osteointegração, interação direta entre o osso e o biomaterial implantado, que promove uma rápida adesão e maior qualidade no procedimento. Resultados de pesquisas anteriores do Núcleo de Biotecnologia Tecidual mostraram produzir um arcabouço descelularizado a partir de tecido ósseo fetal com características morfológicas ideais para ser um novo e promissor biomaterial ósseo. Continuando as pesquisas, esse projeto tem como objetivo avaliar a citotoxicidade do biomaterial quando em contato com células tronco mesênquimas (CTM). Foram realizados a descelularização do biomaterial ósseo fetal de origem bovina e em seguida analisados o valor do DNA e SDS residual, composição elementar e teste de citotoxicidade com células humanas derivadas do mesênquima estromal de tecido adiposo. Por fim, esse trabalho avaliou os Scaffolds ósseos desenvolvidos nesse trabalho apresentaram baixa biocompatibilidade *in vitro* demonstrando na baixa adesão das células no material.

Palavras-chave: osteogênese, matriz extracelular descelularizada, biomaterial, bioengenharia tecidual.

ABSTRACT

The regeneration of bone defects of different origins is still a challenge in the medical and dental fields. Currently, numerous bone substitutes are used in grafting procedures resulting from injuries or trauma. However, only a few manage to promote biochemical interactions with the body, being the targets of research in bone tissue regeneration. Therefore, tissue bioengineering is responsible for evaluating the capacity for osseointegration, a direct interaction between the bone and the implanted biomaterial, which promotes rapid adhesion and higher quality in the procedure. Results of previous research from the Tissue Biotechnology Center have shown to produce a decellularized scaffold from fetal bone tissue with morphological characteristics ideal to be a new and promising bone biomaterial. Continuing the research, this project aims to evaluate the cytotoxicity of the biomaterial when in contact with mesenchymal stem cells (MSC). The decellularization of fetal bone biomaterial of bovine origin was performed and then the value of residual DNA and SDS, elemental composition and cytotoxicity test with human cells derived from adipose tissue stromal mesenchyme were analyzed. Finally, this study evaluated the bone scaffolds developed in this study showed low biocompatibility in vitro, demonstrating the low adhesion of the cells to the material.

Keywords: osteogenesis, decellularized extracellular matrix, biomaterial, tissue bioengineering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Blocos de ossos bovinos seccionados (A e B). Bloco de ossos bovinos após limpeza (C).	32
Figura 2 Ossos pré-descelularização (A), Ossos pós-descelularização (B), Discos ósseos cortados (C).	33
Figura 3 Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco de osso fetal descelularizado (FD, n=6) e controle in natura (n=6). Os dados estão expressos em média EPM; ($p < 0,01$; Teste t não pareado).	34
Figura 4. Curva da concentração de SDS ao longo das lavagens de PBS	35
Figura 5. Análise elementar do osso fetal referente aos elementos carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM.	36
Figura 6. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso fetal. Barra de escala: A: 1mm, B e E: 500 μ m, C e F: 100 μ m e D e G: 10 μ m. Com 16x, 50x, 100x e 1.000x de magnificação, respectivamente	37
Figura 7. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso comercial. Barra de escala: A: 1mm, B e E: 500 μ m, C e F: 100 μ m e D e G: 10 μ m. Com 16x, 50x, 100x e 1.000x de magnificação, respectivamente	37
Figura 8. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso comercial e fetal após a cultura de células. Barra de escala: A e C: 500mm, B e D: 50 μ m. Com 50x, e 300x de magnificação, respectivamente.....	38
Figura 9. Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 200 μ m, B: 100 μ m.....	39
Figura 10 Avaliação da proliferação celular por Alamar Blue do controle (n=12), Disco Fetal (n=12) e Disco Comercial (n=12) após 1 e 7 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; Teste t de Student; ($p < 0,0001$)......	41

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional

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

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

MEV – Microscopia Eletrônica De Varredura

N – Nitrogênio

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

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SLES - Sodium Lauril Éter Sulfato

Tris-HCl – Tris Hidroximetil Aminometano Cloridrato (HCl)

Sumário

Sumário	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS	15
1.1.2 TIPOS DE BIOMATERIAIS.....	17
1.2 CÉLULAS-TRONCO NA MEDICINA REGENERATIVA	19
1.2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVO	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 COLETA DO MATERIAL	24
4.2 DESCELULARIZAÇÃO DO BIOMATERIAL	24
4.3 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO	25
4.3.1 ANÁLISE DO DNA RESIDUAL	25
4.3.2 ANÁLISE DO SDS RESIDUAL.....	27
4.4 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)	27
4.5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS SCAFFODLS.....	28
4.5.1 CULTURA CELULAR	28
4.5.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	29
4.6 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	30
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO	32
5.1.1 ANÁLISE DO DNA RESIDUAL	34
5.1.2 ANÁLISE DO SDS RESIDUAL.....	35
5.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)	36
5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	36
5.4AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS SCAFFODLS.....	39
5.4.1 CULTURA CELULAR	39
5.4.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	40
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, serve de suporte para os tecidos moles e protege órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea e proporciona apoio aos músculos esqueléticos. Além dessas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons que auxilia na homeostase corporal (Junqueira & Carneiro, 2013).

O osso é constituído por uma fração inorgânica composto pela deposição de hidroxiapatita e água compondo a maior parte do seu peso, além de uma fração orgânica, composta por células, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos; colágeno tipo I; proteoglicanos; proteínas não colágenas e lipídios, que correspondem basicamente, a matriz extracelular. A associação das frações orgânicas e inorgânicas confere rigidez e resistência desse tecido (Doblaré, Garcia, & Gómez, 2004).

O tecido ósseo tem a capacidade de remodelação em resposta a estímulos ou danos mecânicos. A falha neste processo devido a traumas significativos, doenças ou condições patológicas, como osteoporose, metástase e malignidade ou sangue restrito, limita a capacidade de recuperação do osso (BHATTACHARJEE, PROMITA, et al. 2017).

Além disso, a relação entre a taxa de natalidade e a expectativa de vida nas últimas décadas contribui para o crescimento da população idosa mundial o que resulta em um aumento de doenças degenerativas ósseas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Os procedimentos de cirurgia ortopédica, por exemplo, substituição total da articulação, representam uma das maiores despesas hospitalares nos EUA. As condições músculo-esqueléticas são responsáveis pela maior proporção de perda de produtividade no local de trabalho (LEZIN, 2016). No Brasil, problemas na coluna vertebral e doenças reumáticas associados à presença de condições osteomusculares atingem cerca de um quinto da população adulta (BEZERRA, ET AL. 2018).

Além disso, foram relatados pela OMS incidentes cada vez maiores de doenças osteomusculares e aumento do custo do tratamento, que analisaram dados de 2000 a 2010. Esses achados exigem uma iniciativa coletiva de desenvolver prevenção e tratamento seguros e econômicos da doença, centrados na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa (Stace, et al. 2016).

Dessa forma, a demanda por enxertos ósseos é alta, com mais de 2,2 milhões de procedimentos realizados em ortopedia e odontologia em todo o mundo. Tornando-se o procedimento de transplante de tecido mais comum após a transfusão de sangue (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015).

No Espírito Santo fraturas ósseas estão entre as cinco principais causas de afastamento do trabalho por acidente ou adoecimento. Em 2017 essas ocorrências ausentaram 2.755 trabalhadores no estado, uma média de pelo menos sete casos por dia (MINISTÉRIO DO TRABALHO, 2018b).

Apesar da relevância, o reparo de defeitos ósseos ainda hoje é um desafio clínico (CHEN et al., 2017). As opções de tratamento para regeneração de tecidos mais utilizadas atualmente envolvem o uso de autoenxertos ou aloenxertos.

Embora o enxerto ósseo autógeno seja considerado o padrão ouro (SPIN-NETO, et al. 2014), o uso desse enxerto apresenta algumas limitações, como risco de infecção, o aumento do tempo cirúrgico, a quantidade limitada de enxerto disponível e a taxas de reabsorção elevadas, principalmente quando utilizadas na forma particulada (NKENKE & NEUKAM, 2014).

Desde a virada do século, ações coletivas foram criadas para desenvolver novos tratamentos a partir de meios seguros e econômico centrados na bioengenharia de tecidos e na medicina regenerativa (STACE, et al. 2016).

1.1 BIOENGENHARIA DE TECIDOS

A bioengenharia de tecidos é uma área que foca na reconstrução da forma e funcionalidade do tecido alvo, suas ferramentas são a ação combinada de biomateriais e células para incentivar a formação do tecido alvo in vitro (Khan, F., & Tanaka, M. 2017). Desde a década de 60, pesquisadores e integrantes da indústria demonstram interesse em biomateriais poliméricos (Wichterle, O., & Lim, D. 1960).

No entanto, para sua aplicação ser bem-sucedida é preciso observar sua estrutura macromolecular, suas interações com células vivas e citocompatibilidade, e como as macromoléculas se organizam por si mesmas para formar uma arquitetura tridimensional (3D) (Khan, F., & Tanaka, M. 2017).

Essas estruturas macromoleculares podem ser de origem natural ou sintética, como polissacarídeos e proteínas que são biomateriais poliméricos naturais bem estabelecidos, que encontraram inúmeras aplicações na regeneração de tecidos (Khan, F., & Ahmad, S. R. 2013).

A Bioengenharia de tecidos ósseos é uma alternativa promissora para superar as limitações dos tratamentos clínicos atuais, como rejeições pós-transplantes, patogenicidade, suprimento limitado, período limitado de armazenamento de tecidos até o transplante, assim como o armazenamento e transporte de tecidos (Malliappan, et al. 2022) em casos de longas distancias.

Suas áreas de aplicações são vastas e inclui substituições de articulações e membros, artérias artificiais e pele, lentes de contato e dentaduras atingindo número crescente de pessoas a cada ano. Sendo a implementação desses materiais por razões médicas, substituindo tecidos doentes ou pode ser motivada por razões puramente estéticas (por exemplo, implantes mamários). Uma demanda crescente por biomateriais surge de uma população envelhecida com maiores expectativas em

relação à sua qualidade de vida (Holzapfel, Boris Michael, et al. 2013).

Um biomaterial ósseo ideal deve satisfazer a critérios essenciais de segurança para sua utilização, como por exemplo: previsibilidade, reprodutibilidade e efetiva regeneração do tecido ósseo na aplicação clínica. Deve também, apresentar atributos específicos para o tecido ósseo como propriedades de osteointegração osteocondução, osteoindução, osteogênese (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014, AMENGUAL-PENAFIEL et al. 2021).

A osteointegração, que pode ser compreendida como a capacidade de um biomaterial ser fixado de maneira definitiva, rígida, clinicamente assintomática e funcional ao osso. A osteocondução é a capacidade de um substituto ósseo de proporcionar uma arquitetura tridimensional adequada que permita o crescimento de capilares, tecido perivascular e células osteoprogenitoras no local de implante. A osteoindução se refere a capacidade do substituto ósseo estimular o recrutamento de células ósseas imaturas para o local de utilização, e a partir de alguma substância (fator) presente, promover a diferenciação dessas células em osteoblastos. Consequentemente, a osteogênese é a capacidade que o dispositivo apresenta para permitir que células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos maduros que produzem de fato o tecido ósseo mineralizado. (URIST, 1965; JOHANSSON; ALBREKTSSON, 2001; MOORE et al., 2011). Muitos desses princípios básicos influenciaram o desenvolvimento de biomateriais nas aplicações de engenharia de tecidos.

1.1.2 TIPOS DE BIOMATERIAIS

Antigamente um dos primeiros materiais convencionais utilizados como implantes foram os de liga metálicas, feitos de cromo-cobalto. Entretanto, suas limitações se caracterizam na oxidação dessas ligas em contato com o ambiente corporal liberando substâncias tóxicas ou de hipersensibilidade, como doenças relacionadas à pele ou até mesmo induzir a carcinogênese (McGregor, D. B., et al. 2000; Wapner, 1991).

Dentre os materiais metálicos utilizados hoje para aplicação em implantes, o titânio e suas ligas são os que mais se aproximam da elasticidade do osso, de modo que seu uso pode reduzir a extensão da proteção contra estresse ao inibir a reabsorção óssea e aumentar a remodelação óssea (Geetha, Manivasagam, et al. 2009). Assim, oferece resistência ideal à corrosão e biocompatibilidade superior. No entanto, também apresenta desvantagens, como baixa resistência ao cisalhamento, limitando sua aplicação como parafusos ou placas, por exemplo (Steinemann, 1998). Um material muito promissor, mas com baixa versatilidade.

Atualmente vários tipos de materiais sintéticos para enxertos ósseos estão disponíveis no mercado. Em sua maioria esses materiais são formados por compostos de fosfato de cálcio e por essa razão oferece um suporte estrutural e osteocondutor. Entretanto, isso não é suficiente para promover a osteogênese e osteoindução (KURIEN & PEARSON, 2013; HANKE & BÄUMLEIN, 2017).

Nesse contexto, a bioengenharia de tecidos é uma área que busca atualmente o desenvolvimento de biomateriais de implante que facilite e promova interações fisiológicas no local da lesão promovendo uma melhoria na qualidade de vida do indivíduo.

Uma alternativa que está no foco das pesquisas é o uso do osso esponjoso xenógeno de origem bovina devido ao seu potencial osteoindutor, aplicações em implantes orais e por possuir estrutura e composição química semelhante ao osso humano (CASTRO-CESEÑA & SÁNCHEZ-SAAVEDRA 2013).

O arcabouço xenógeno é apontado como ideal pela bioengenharia somado a técnica de decelularização da matriz nativa do tecido. Essa técnica permite que os pesquisadores obtenham um material com os elementos da matriz extracelular preservados e livre do conteúdo celular. O produto final é capaz de fornecer um suporte estrutural tridimensional específico que oferece um meio adequado e propício para desenvolvimento das células (PAPADIMITROPOULOS et al., 2015) (JADALANNAGARI et al., 2017). Como também, minimiza os problemas de biocompatibilidade, pois não é imunogênico entre diferentes espécies (LEI, 2015).

Atualmente existem diversos protocolos de descclularização, o princípio máximo dessas técnicas se baseia na remoção das células do tecido alvo. Uns utilizam o calor para desnaturar e desprender as proteínas que agrupam as células nos tecidos. Outros utilizam enzimas como a tripsina ou detergentes iônicos como o SDS ou SLES (Sodium Lauril Éter Sulfato) para desempenhar esse mesmo papel. Esses detergentes atuam solubilizando as membranas celulares e as membranas nucleicas, sendo muito eficaz para a remoção de células (EMAMI, Asrin et al.2021).

Contudo, a utilização desse detergente pode danificar proteínas, remover glicosaminoglicanos e fatores de crescimento assim como promover alterações na estrutura, composição e bioatividade na matriz extracelular (HE, et al., 2017).

Para o desenvolvimento de um novo biomaterial para fabricação de enxerto ósseo, deve ser cumpridas etapas pré-clínicas para garantir sua segurança e aplicabilidade. Ensaios com cultura de células proporcionam um ambiente semelhante ao fisiológico e são ótimos indicadores em testes de

toxicidade do material (SCHECROUN; DELLOYE, 2004; DUFRANE, 2017).

Por meio de uma combinação de *scaffolds* de biomateriais tridimensionais (3D), células e moléculas bioativas a engenharia, pesquisas avançam no desenvolvimento de novos biomateriais e na missão de reparar tecidos danificados. As células-tronco são as células com maior potencial dentre as pesquisas devido ao seu potencial se diferencial em vários tipos de células.

1.2 CÉLULAS-TRONCO NA MEDICINA REGENERATIVA

As células-tronco são definidas como células que possuem a capacidade de autorrenovação, são indiferenciadas podendo se diferenciar em várias linhagens celulares, apresentam a capacidade de proliferação e regeneração. São encontradas desde os primeiros estágios do desenvolvimento humano até o fim da vida (Potten & Loeffler, 1997).

Diferentes tipos de Células-Tronco podem ser classificados por meio da origem das células e/ou pelo potencial de diferenciação celular.

De acordo com a sua origem, as células tronco são classificadas como: Embrionárias, presentes na massa celular interna de embriões pré-implantação e tem a capacidade de formar todas as três camadas germinativas embrionárias (ectoderme, endoderme e mesoderma) e Adultas, presentes em vários tecidos e órgãos e têm a capacidade de produzir pelo menos um tipo de célula diferenciada. (Sobhani, 2017; Larijani, 2012; Nandedkar et. Al, 2003).

De acordo com a plasticidade, ou seja, capacidade de uma célula tronco se diferenciar em um, poucos ou muitos tipos de células diferentes, as células-tronco podem ser classificadas em totipotente, pluripotente, multipotente oligopotente e unipotente (Sobhani, 2017; Larijani, 2012; Nandedkar et. Al, 2003).

Desde a sua descoberta, tanto as células-tronco embrionárias (THOMSON et al., 1998) quanto as células-tronco adultas (WU et al., 1968) vem sendo estudadas quanto a suas características e plasticidade. Estudos sugerem que células-tronco possuem atuação marcante no desenvolvimento embrionário e que no tecido adulto atuem na reparação e regeneração de microlesões em diversos órgãos e tecidos do corpo humano. Estas células também têm sido utilizadas no desenvolvimento de engenharia de tecido para construção de órgãos *in vitro* (BIANCO et al., 2001; BLUTEAU et al., 2008).

Apesar da plasticidade das células-tronco embrionárias ser maior do que a das células-tronco adultas, essas tem sido preferencialmente utilizada em pesquisas com seres humanos. Isso se deve, pela obtenção de células-tronco embrionárias provoca destruição de embrião, o que levanta questões éticas sobre viabilidade de embriões congelados, direito a vida e definições sobre o início da vida humana (LO; PARHAM, 2009).

1.2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram descritas pela primeira vez por Fridensteins et al., em 1976, como células clonais aderentes ao plástico e como fonte de linhagens osteoblásticas, adipogênicas e condrogênicas.

A medula óssea é a principal fonte de CTM, mas essas células também podem ser obtidas de outros tecidos. Há um número crescente de relatos que descrevem a obtenção dessas células do tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico, sangue periférico, fígado fetal, pulmão e até mesmo a polpa de dentes decíduos (KANETO et al. 2017).

Os primeiros estudos envolvendo CTMs focaram em determinar os métodos e parâmetros de cultura celular, caracterização e diferenciação dessas células e nos métodos para a detecção de linhagens diferenciadas.

Recentemente, um número crescente de estudos envolvendo a análise da expressão gênica de CTMs indiferenciadas ou em processo de diferenciação foi observado (Kulterer et al., 2007; Luo et al., 2004; De Jong et al., 2004).

No campo da medicina regeneração óssea, essas células atuam na durante a ossificação intramembranosa, onde se diferenciam diretamente em células formadoras de osso, enquanto a ossificação endocondral envolve a formação de um intermediário cartilaginoso ou calo que é mineralizado em estágios subsequentes de ossificação. As aplicações da engenharia de tecidos ósseos têm se concentrado na diferenciação osteogênica direta de células osteoprogenitoras, por exemplo, semeando células-tronco mesenquimais indiferenciadas em *scaffolds* ou implantando *scaffolds* com fatores de crescimento estimuladores do osso e proteínas recombinantes, para promover diretamente a cicatrização osteogênica através da ossificação intramembranosa (Wong, Suet-Ping, et al. 2015, ROOHANI, et al. 2022).

Com isso, metodologias de análises *in vitro* são necessárias para compreensão da interação do biomaterial ósseo com os tecidos, sendo uma importante ferramenta para melhor compreensão do desfecho clínico do biomaterial.

2. JUSTIFICATIVA

Em razão da necessidade de maior investigação de substitutos para enxertos utilizados nos tratamentos atuais, no presente trabalho se propõe a realizar a análise da cultura de células-tronco mesenquimais em arcabouço de osso bovino descelularizado.

Esse material foi desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (Depósito de patente INPI: BR1020180037269) e mostrou ser promissor por manter as características estruturais morfológicas semelhantes ao tecido nativo e a manutenção de componentes da matriz extracelular óssea como colágeno, glicosaminoglicanos e glicoproteínas.

Portanto, dando continuidade à pesquisa, o teste *in vitro* representa um passo necessário para compreensão da interação do biomaterial ósseo com os tecidos e é uma importante ferramenta para melhor compreensão do seu desfecho clínico (DUFRANE, 2017).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade do biomaterial ósseo descelularizado desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa sobre a patente INPI:BR1020180037269.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a aderência, morfologia, adesão e proliferação celular, de células-tronco mesenquimais em contato com superfícies do biomaterial de osso descelularizado.

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi desenvolvido junto ao grupo de pesquisa em bioengenharia tecidual do Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NTB) e Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), com sede no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES). Biomaterial de osso descelularizado foi produzido, tratado e caracterizado de acordo com a metodologia presente na patente INPI: BR1020180037269 desenvolvida em projetos anteriores.

4.1 COLETA DO MATERIAL

Foram utilizados ossos de descarte de fetos bovinos coletados no frigorífico na região da Grande Vitória. Após a coleta, o material foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado em caixas térmicas contendo gelo, e transportados até o Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NTB), local onde foram devidamente limpos e dissecados. Após a limpeza e dissecação, para desenvolvimento do estudo, foram selecionadas as áreas específicas dos centros de ossificação endocondral dos côndilos e da região de metáfise de fêmures e tíbias. Com utilização de serra elétrica circular, o osso esponjoso presente nessas regiões ósseas foi devidamente seccionado na forma de fragmentos ósseos que mediam cerca de 2,0 a 3,0 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura.

Após serem serrados, todos os fragmentos ósseos foram lavados em água corrente e distribuídos de forma aleatória em frascos herméticos para a próxima etapa do processo e armazenados em freezer (-80°C).

4.2 DESCELULARIZAÇÃO DO BIOMATERIAL

Para o processo de descelularização os 9 fragmentos de osso bovino fetal e 9 fragmentos de osso bovino adulto de 1,5mg foram tratados por imersão

em 400 mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) contendo SDS (Docecil Sulfato de Sódio) 0,5% e Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,1%, sob agitação continua em uma incubadora shaker de bancada com agitação (300rpm) e aquecimento à temperatura de 37°C, durante 72 horas. As soluções foram trocadas a cada 12 horas.

Após finalizado o tempo de tratamento proposto para a decelularização, as amostras foram lavadas em solução PBS por 24 horas para remoção dos resíduos de SDS e EDTA. Em seguida foram lavadas em uma solução clarificante com peróxido de hidrogênio por 30 minutos, uma solução tampão PBS para remoção de resíduos de peróxido, duas vezes, por 30 minutos, e em seguida, foram secas em estufa a 37°C durante 48 horas. Após secagem, utilizando-se um micromotor elétrico (LB100, Beltec) acoplado com broca trefina (6,2 mm), foram removidas amostras ósseas em formato de discos de 0,6 cm diâmetro e 0,5cm de espessura.

4.3 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

4.3.1 ANÁLISE DO DNA RESIDUAL

Na análise de determinação de conteúdo de DNA, foi utilizado protocolo de extração salina já descrito na literatura (HANOTTE; BRUFORD; BURKE, 1992 ; adaptado por David Vieites - U.C. Berkeley), as amostras de disco ósseo bovino de foram tratadas e manipuladas em ambiente de fluxo laminar estéril (tratado com luz ultravioleta por 15 minutos) mantidas em freezer -80 °C, juntamente com amostras de discos *in natura*, foram devidamente preparadas em tubos de polipropileno de 2 mL com tampa rosqueável (FastPrep®, Qbiogene), contendo 1 mL de solução PBS (pH 7,4) e uma esfera cerâmica (FastPrep®, Qbiogene) estéreis. Os tubos preparados foram processados em homogeneizador de amostras (Modelo FASTPREP-24™ 5G, MP BIOMEDICALS), sob velocidade calibrada (6 m/s), em quatro ciclos de 30 segundos de duração. Entre cada ciclo, os tubos contendo as amostras foram refrigerados em gelo durante cinco

minutos (SARAH BECK-CORMIER, [S.d.]). Após a homogeneização, as amostras foram secas em equipamento liofilizador (Modelo L101, Liotop®) durante 24 horas, no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

As amostras secas de osso bovino Fetal descelularizado (FD) e Fetal controle (FC) *in natura* (n=6 cada), foram alocadas em microtubos de 2mL 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 (20 µg/µL). Em seguida, os tubos foram encubados à 55°C *overnight*. Após encubação, 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 35 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 ressuspenso em 50 µL de água ultrapura e mantidos *overnight* em geladeira (4 °C). Por fim, procedeu-se com leitura em triplicata em equipamento espectrofotômetro (Modelo NanoDrop® 2000, Thermo Scientific) no Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFES.

4.3.2 ANÁLISE DO SDS RESIDUAL

A análise de SDS residual foi elaborada utilizando uma adaptação do ensaio de azul de metileno descrito por ZVAROVA et al. (2016).

Primeiramente, foi confeccionada uma curva padrão de SDS a partir de uma solução de SDS a 2%. Foram transferidos 1mL da solução de SDS a 2% para um tubo contendo 1mL de azul de metileno a 0,0125%. Diante dessa solução, com concentração resultante de SDS a 1%, foram realizadas diluições em 8 pontos distintos (0,5% até 0,01%) e em seguida prosseguiu-se com a leitura das diluições em triplicata à 650nm em Espectrofotômetro (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher).

Para a mensuração de SDS residual, foi utilizado o osso em grânulo, a matriz digerida (pré-gel) e o hidrogel fetal, todos analisados em quadruplicata. Para quantificar, 5µL de cada amostra foram transferidos para microtubos de 2mL e em seguida, pipetados igualmente em cada tubo o volume de 495µL de solução de azul de metileno a 0,0125%. As amostras foram agitadas e deixadas em repouso por 30 minutos.

Após essa etapa foi adicionado 1mL de clorofórmio em cada microtubo, depois agitados e deixados em repouso por 30 minutos. As amostras foram lidas em triplicata na faixa de 650nm em espectrofotômetro (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher).

4.4 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

Para quantificação dos elementos Carbono (C), Hidrogênio (H) e Nitrogênio (N), amostras de osso particulado de origem fetal (n= 6) foram liofilizadas, pesadas e analisadas usando o FlashSmart Elemental Analyzer (Thermo Scientific, EUA).

4.5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS SCAFFODLS

4.5.1 CULTURA CELULAR

As células com comportamento de células-tronco mesenquimais (CTM) foram adquiridas em parceria com o banco de células do Nucleo de Genetica Humana e Molecular (NGHM-UFES). O núcleo coletou amostras de tecido adiposo humano de aproximadamente 0,5 cm² de diâmetro obtida de cirurgias ortopédicas de correção realizada no Hospital Infantil Nossa Senhora da Glória, Vitória (ES) que seguiram para o laboratório para a realização das culturas primarias e em seguida expansão. 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 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% CO₂. Ao atingir uma confluência de 80-90 %, as células foram submetidas ao processo de cultura secundária. Essas células foram então confirmadas como possível perfil de células-tronco mesenquimais (CTM's) a partir de análises de diferenciação celular pelo grupo de pesquisa do NGHM-UFES e cedidas ao NBT.

Para cultura de rotina, as CTM's foram incubadas a 37°C/5% CO₂ com meio basal StableCell™ DMEM- high glucose (Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, South America) 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.

4.5.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Para a avaliação da proliferação e viabilidade celular, os discos ósseos fetais e comerciais foram submetidos a uma etapa de descontaminação que consistiu em: 2 lavagens com NaHCO_3 10% v/v e duas lavagens com PBS 1% v/v para neutralizar o pH, secagem na estufa à 37°C e por fim irradiação com luz UV por 30min nas faces do disco. Após essa etapa 1ml de meio basal StableCell™ DMEM- high glucose (Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, South America) e 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, EUA) foi adicionado nos poços com os discos e incubados a 37° C, 5% CO₂ por 24 horas.

Após as 24 horas o meio foi retirado e as CTM's foram semeadas em placas de 48 poços na densidade de 10⁴/disco. Como controle foi utilizado CTM's sem disco. Após 1 e 7 dias de cultura, foi realizada a avaliação da proliferação celular utilizando o ensaio de Alamar Blue.

A metodologia utiliza a resazurina (Alamar Blue®), de cor azul e não fluorescente, é reduzida a resofurin, de cor rosa e fluorescente, e não precipita após ser reduzida; porém o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não está bem esclarecido, o qual pode ocorrer por reações enzimáticas ou químicas em células viáveis. O Alamar Blue® é empregado em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular, determinação da função mitocondrial de acordo com o fabricante. Para o nosso estudo, foram adicionados 20 mL de Alamar Blue®, dissolvido no meio de cultura, na concentração de 1,5 mM. Após 5 horas de incubação a 37°C, fez-se a leitura em leitor placas (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Para a análise da absorbância foram comparadas amostras

controle antes e depois da presença dos discos.

4.6 ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para essa análise, comparamos as amostras disco ósseo fetal com disco ósseo comercial (Geistlich Bio-Oss® Block) antes e depois da cultura para observar a presença de células no biomaterial.

Os discos foram liofilizados e depois cobertos 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) e para a determinação da composição elementar por energia dispersiva de raios X (EDS).

Após a cultura os discos foram medidos e fixados (glutaraldeído 2,5% + formaldeído 2%) em solução tamponada (Cacodilato 0,1mol/L) por 24 horas e posteriormente lavados em tampão Cacodilato (0,1 mol/L; pH 7,2-7,4) para pós-fixação em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e Tetróxido de Ósmio 1,0% tamponadas (Cacodilato 0,1mol/L) por uma hora a temperatura ambiente. Após a pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas com tampão cacodilato 0,1M. As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (0, 30, 50, 70, 90 e 100%) por 30 minutos cada banho e levadas para secagem em ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis) e posterior cobertura 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), equipado com detector de raios X (Bruker XFlash 6/10).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise Estatística A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism Versão 9.51 (GraphPad Software; San Diego, Califórnia, EUA, Versão Completa). Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste Shapiro-Wilk. Todos os dados apresentados encontravam-se dentro de uma distribuição Gaussiana (comparado ao teste de normalidade com $\alpha = 0,05$). Foi aplicado o teste t de Student não pareado para comparação entre dois grupos independentes. Para análises intra-grupos foi utilizado o teste ANOVA, uma ou duas vias, seguido do post hoc de Tukey para múltiplas comparações. As amostras entre os grupos foram consideradas significativas quando o valor de p.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

Os ossos foram cortados em fragmentos de cerca de 2,0 a 3,0cm de diâmetro e 0,5cm de espessura com o auxílio de uma serra circular. As áreas escolhidas foram os centros de ossificação endocondral dos côndilos e da região de metáfise de fêmures e tíbias (Figura 1). Essas regiões foram selecionadas devido a sua estrutura altamente porosa em comparação com as outras partes do osso. Após serem serrados, todos os fragmentos ósseos foram lavados em água corrente e distribuídos de forma aleatória em frascos herméticos para a próxima etapa do processo e armazenados em freezer (-80°C).

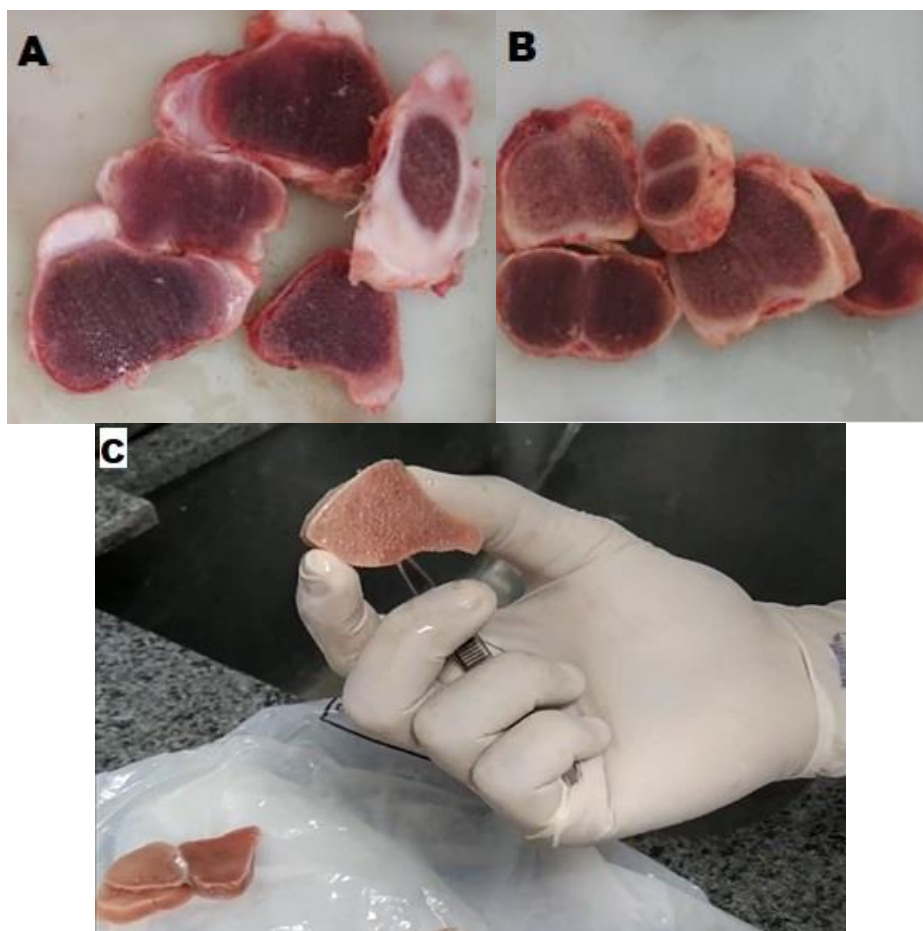


Figura 1. Blocos de ossos bovinos seccionados (A e B). Bloco de ossos bovinos após limpeza (C).

Os blocos de ossos descelularizados de origem adulta e fetal apresentaram um aspecto esbranquiçado (Figura 2) sugerindo uma remoção de células sanguíneas (SAWKINS et al., 2013). Após o processo de descelularização, foi utilizado um micromotor elétrico (LB100, Beltec) acoplado com broca trefina (6,2 mm), foram removidas amostras ósseas em formato de discos de 0,6 cm diâmetro e 0,5cm de espessura (Figura 2C).

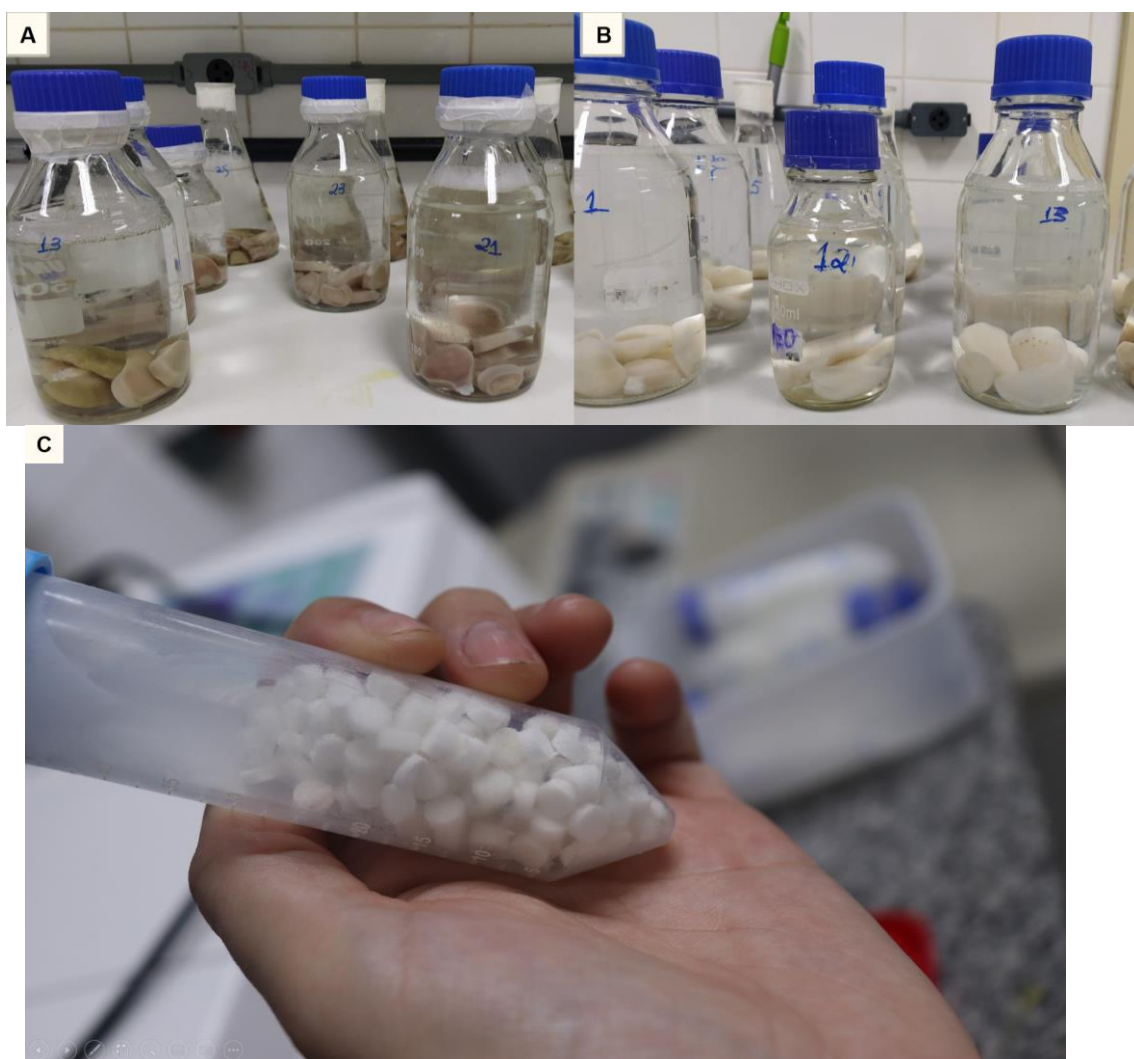


Figura 2 Ossos pré-descelularização (A), Ossos pós-descelularização (B), Discos ósseos cortados (C).

5.1.1 ANÁLISE DO DNA RESIDUAL

Analisar a quantidade de DNA residual do tecido após a descelularização é o padrão ouro para afirmar a eficiência da técnica. Aqui, realizamos a quantificação de DNA do disco descelularizado em comparação com o disco *in natura* (Figura 3).

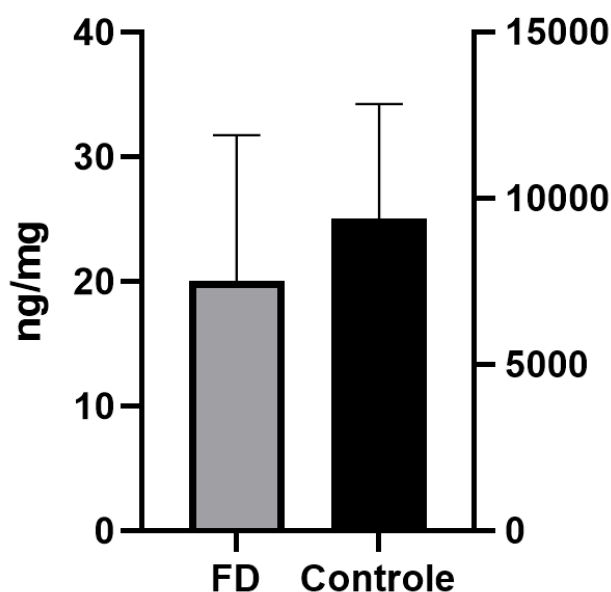


Figura 3 Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco de osso fetal descelularizado (FD, n=6) e controle *in natura* (n=6). Os dados estão expressos em média EPM; ($p < 0,01$; Teste t não pareado). COLOCAR O ASTERISCO PARA MOSTRAR A DIFERENÇA ESTATÍSTICA

De acordo com os resultados apresentados na Figura 3 podemos inferir que o protocolo de descelularização para o osso fetal obteve êxito devida à redução significativa da quantidade de DNA e por conseguinte a redução de células no tecido ósseo.

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). Esse Padrão determina que a quantidade de DNA nos tecidos descelularizados não devem ultrapassar 50 ng/mg de tecido seco (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011).

Além disso, quando comparamos as medias entre as amostras de tecido nativo sobre o tecido descelularizado em porcentagem, indicamos uma

redução de aproximadamente 99% na remoção de DNA. Mostrando mais uma vez o sucesso do protocolo, visto que alguns estudos utilizam os estudos de Fernández-Pérez e Ahearne (2019), onde o valor estabelecido foi de cerca de 80% de remoção de DNA em comparação com tecido nativo.

5.1.2 ANÁLISE DO SDS RESIDUAL

Para a análise de SDS residual nas amostras descelularizadas foi coletada o efluente das lavagens de PBS ao longo do processo observar o decaimento da concentração do SDS (Figura 4).

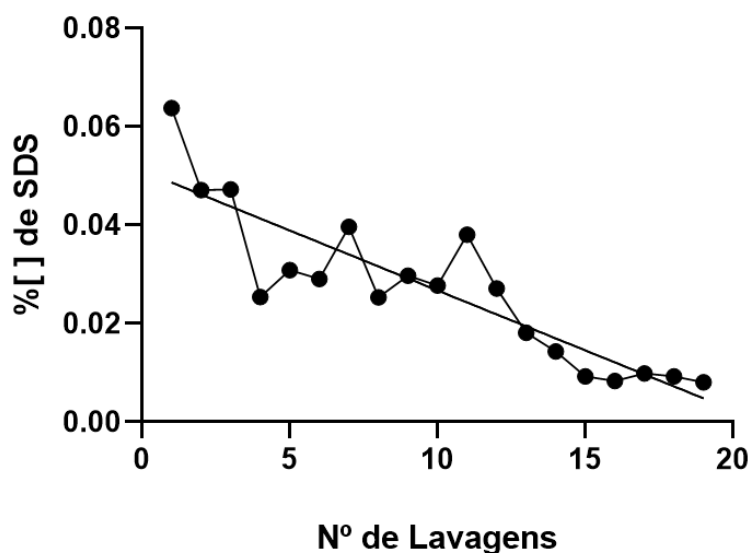


Figura 4. Curva da concentração de SDS ao longo das lavagens de PBS.

A concentração de SDS tem uma presença determinante nos ensaios em testes *in vitro*, mesmo em pequenas quantidades pode interferir no crescimento celular (FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019; Emami, et al. 2020). Discutiremos mais sobre esse evento no tópico 5.4.2.

5.2 ANÁLISE ELEMENTAR (CHN)

Para identificação e determinação da composição das amostras de disco fetal foi utilizado a análise elementar de CHN, que determina os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio (Figura 5). Um padrão semelhante foi encontrado nos estudos de Emami, et al. (2020) para descelularização a partir de detergente SDS.

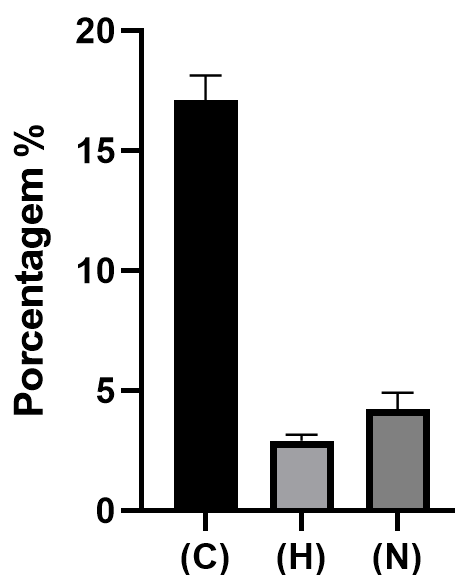


Figura 5. Análise elementar do osso fetal referente aos elementos carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM.

5.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação da microarquitetura dos discos fetais e a comparação com o produto comercial (Geistlich Bio-Oss® Block) como demonstrado na Figura 6.

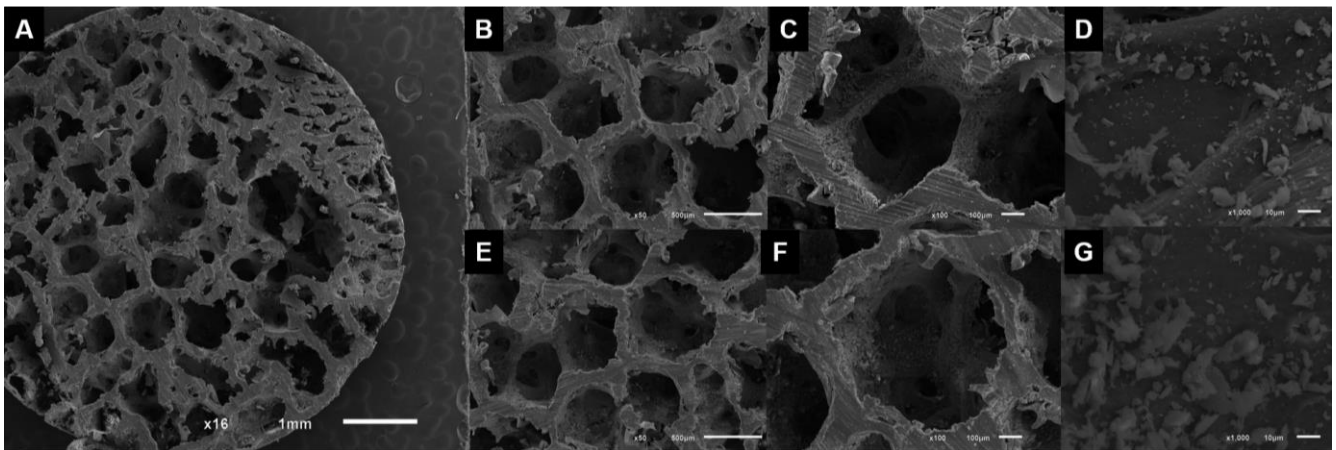


Figura 6. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso fetal. Barra de escala: A: 1mm, B e E: 500 µm, C e F: 100 µm e D e G: 10 µm. Com 16x, 50x, 100x e 1.000x de magnificação, respectivamente.

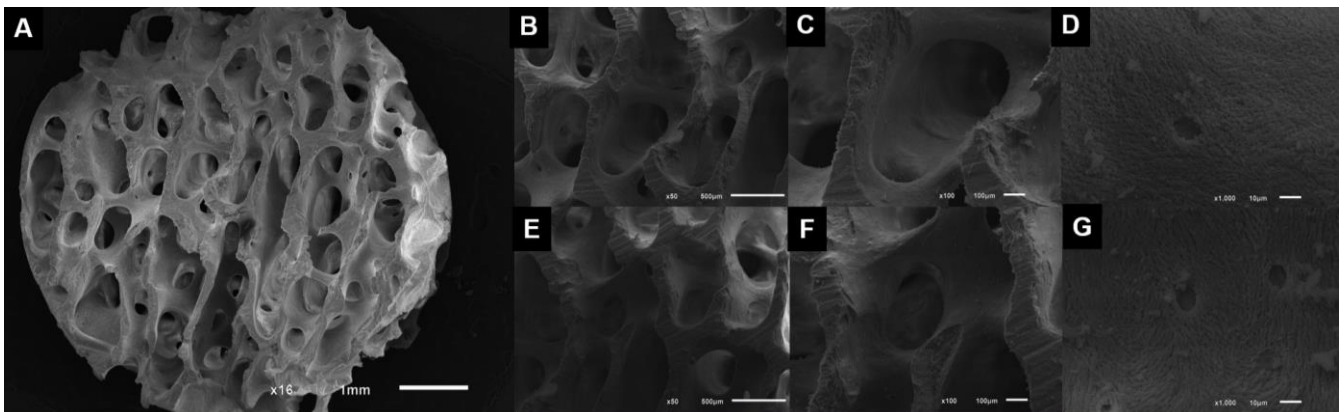


Figura 7. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso comercial. Barra de escala: A: 1mm, B e E: 500 µm, C e F: 100 µm e D e G: 10 µm. Com 16x, 50x, 100x e 1.000x de magnificação, respectivamente.

A partir dessas imagens, é possível a visualização do arcabouço ósseo contendo similaridades de formato entre ambas as amostras. Assim como a identificação das lacunas onde se encontrariam os osteócitos completamente vazias (Figuras 7 e 8; D e G). As ranhuras e presença de folículos apresentados na Figura 6 podem ser associadas ao material que foi utilizado para o corte e confecção do disco fetal descelularizado. Essas imagens são semelhantes ao encontrado no estudo de Emami, et al. 2020

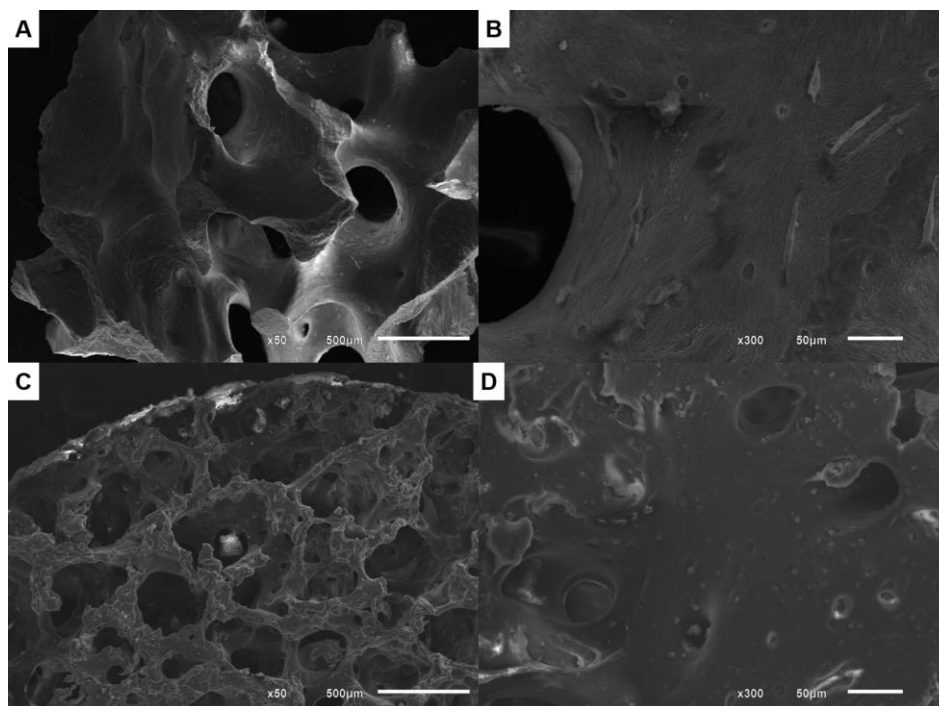


Figura 8. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos discos de osso comercial e fetal após a cultura de células. Barra de escala: A e C: 500µm, B e D: 50 µm. Com 50x, e 300x de magnificação, respectivamente.

Após a etapa de cultura celular, podemos observar na Figura 8 a presença nas amostras de osso comercial e uma quantidade reduzida nas amostras de osso fetal. Isso corrobora para a biocompatibilidade de ambos os materiais.

5.4 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS SCAFFODLS

5.4.1 CULTURA CELULAR

De acordo com o *The International Society for Cellular Therapy* (2006), a caracterização de uma linhagem celular é de extrema importância para estudos *in vitro*. No caso das células-tronco mesenquimais deve-se analisar aspectos morfológicos, capacidade plástica de diferenciação e a expressão de genes específicos.

As células que analisamos possuem com características morfológicas típica fibroblastóide, na qual as células são alongadas e fusiformes, conforme descrito Fridensteins et al., em 1976 além de estudos anteriores do grupo do NGHМ comprovarem seu potencial de diferenciação (Figura 9).

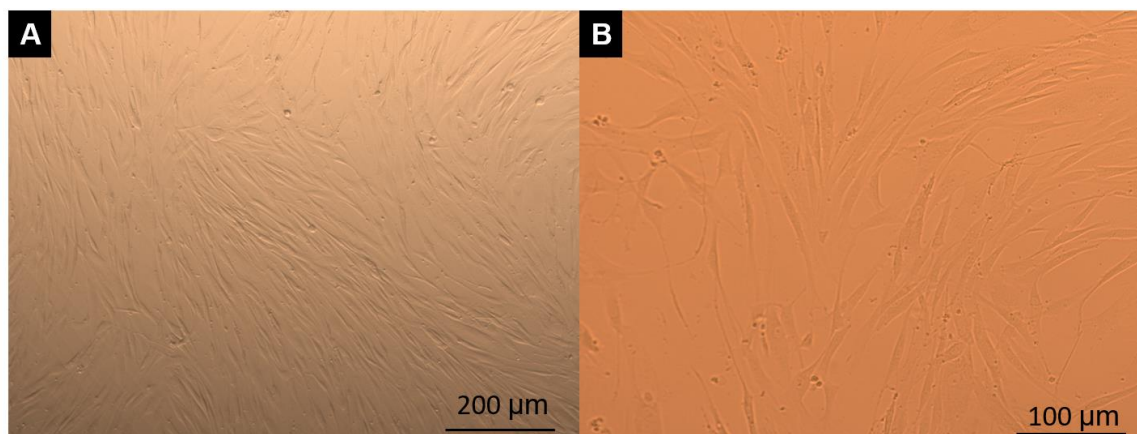


Figura 9. Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 200 µm, B: 100 µm.

Entretanto, com as novas descobertas na área molecular optou-se pela inclusão da expressão de marcadores de superfície mesenquimais CD105, CD73 e CD90, ausência de expressão de marcadores de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR além da capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro*. (KFOURY & SCADDEN, 2015; MORTADA, 2018). Portanto, para esse trabalho vamos sugerir que as células extraídas possuem um

comportamento de CTM, devido aos estudos feitos sobre diferenciação celular no NGHM-UFES. Entretanto, estudos sobre a expressão gênica antes e após o contato com o meio indutor devem ser executados para comprovar a natureza das células extraídas.

5.4.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Uma das etapas pré-clínicas mais importantes é a análise do comportamento das células na presença de um determinado composto. Para esse estudo, foi utilizado o ensaio de Alamar Blue®, no qual a determinação da biocompatibilidade e viabilidade das células é apresentada pela diferença entre a absorbância do comprimento de onda da resazurina de cor azul e a resofurin, de cor rosa e fluorescente pela espectrofotometria.

Nesse ensaio dividimos em 3 grupos, onde o grupo Fetal é composto por células que entraram em contato com o disco ósseo de descelularizado de origem fetal. O grupo comercial é composto pelas células que entraram em contato com o disco ósseo comercializado (Geistlich Bio-Oss® Block) e por fim o grupo controle é composto por células que não entraram em contato com nenhum biomaterial (Figura 10).

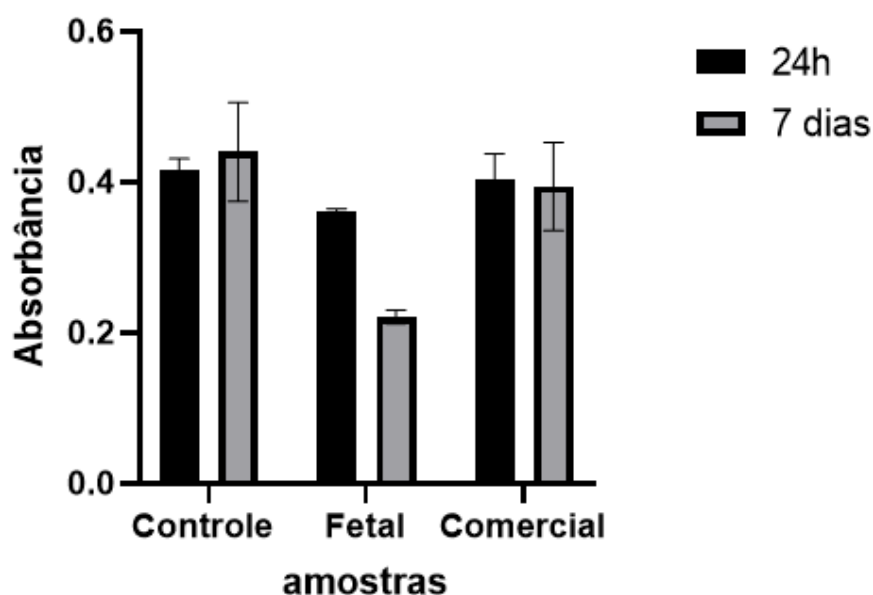


Figura 10 Avaliação da proliferação celular por Alamar Blue do controle (n=12), Disco Fetal (n=12) e Disco Comercial (n=12) após 1 e 7 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média $\pm$ EPM; Teste t de Student; ($p < 0,0001$).

De acordo com a Figura 10, podemos inferir que a única amostra que apresentou uma queda na absorbância após os 7 dias de exposição foi as amostras de disco fetal descelularizada. Enquanto no controle houve uma proliferação esperada e nas amostras de disco ósseo comercial houve uma pequena queda na absorbância. Como a absorbância está diretamente ligada a proliferação de células podemos inferir que o único grupo que diminuiu a sua população foi o grupo que ficou exposto ao disco fetal descelularizado.

Alguns estudos pontam a citotoxicidade do SDS residual nas amostras e esse fator pode estar influenciando na viabilidade das células no disco ósseo fetal (GRATZER; HARRISON; WOODS, 2006; FERNÁNDEZ-PÉREZ; AHEARNE, 2019).

Mesmo após as lavagens adicionais até a etapa de cultura celular, o limiar da concentração de SDS se mostrou nesse estudo ser de aproximadamente 0,008%, ou seja, quatro vezes mais que o limiar citotóxico encontrados nos estudos de Zvarova et al. (2016) para CTM's.

Logo, esse resultado sugere que o SDS residual presente nas amostras de disco fetal, pode estar influenciando na proliferação celular. Estudos de Emami, et al. 2020 afirmam que a descelularização por SDS reduz significativamente a quantidade de colágeno e outros carboidratos, elementos importantes que compõem a matriz extracelular.

Entretanto, há uma necessidade em caracterizar as linhagens celulares e os efeitos in vivo em scaffolds para uso na bioengenharia tecidual para relacionar com mais precisão sua viabilidade delas, uma vez que diferentes tipos celulares possuem limiar citotóxicos diferentes.

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho conclui a eficiência da patente INPI: BR1020180037269 desenvolvida em projetos anteriores, em fabricar um biomaterial ósseo descelularizado. Uma vez que foi encontrada a redução de aproximadamente 99% de DNA para as amostras de osso fetal.

Os Scaffolds ósseos desenvolvidos nesse trabalho apresentaram baixa biocompatibilidade *in vitro* demonstrando na baixa adesão das células no material.

Apesar da eficiência para remoção de células e proliferação celular, sabe-se que o SDS é um detergente citotóxico e nesse estudo pode ser responsável por baixos níveis de crescimento celular em tecidos descelularizados.

Ainda há muito para ser estudado, pesquisado e entendido em relação aos diferentes estágios que levam à formação de um tecido. Dessa forma, esse projeto tem sua importância, pois metodologias de análises *in vitro* são necessárias para compreensão da interação do biomaterial ósseo com os tecidos, sendo uma importante ferramenta para melhor compreensão do desfecho clínico do biomaterial.

7 REFERÊNCIAS

ADVINCULA, M. C. et al. Osteoblast adhesion and matrix mineralization on sol-gel-derived titanium oxide. **Biomaterials**, v. 27, n. 10, p. 2201–2212, abr. 2006.

AMENGUAL-PENAFIEL, Luis et al. Osteoimmunology drives dental implant osseointegration: A new paradigm for implant dentistry. **Japanese Dental Science Review**, v. 57, p. 12-19, 2021.

BARBECK, M. et al. Induction of multinucleated giant cells in response to small sized bovine bone substitute (Bio-Oss™) results in an enhanced early implantation bed vascularization. **Annals of maxillofacial surgery**, v. 4, n. 2, p. 150, 2014.

Bezerra, M. A. M., Hellwig, N., Pinheiro, G. D. R. C., & Lopes, C. S. (2018). Prevalence of chronic musculoskeletal conditions and associated factors in Brazilian adults–National Health Survey. **BMC public health**, 18(1), 287.

Bhattacharjee, P., Kundu, B., Naskar, D., Kim, H. W., Maiti, T. K., Bhattacharya, D., & Kundu, S. C. (2017). Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. **Acta biomaterialia**, 63, 1-17.

Castro-Ceseña, A. B., Sánchez-Saavedra, M. P., Novitskaya, E. E., Chen, P. Y., Hirata, G. A., & McKittrick, J. (2013). Kinetic characterization of the deproteinization of trabecular and cortical bovine femur bones. **Materials Science and Engineering: C**, 33(8), 4958-4964.

DOMINICI et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**; 2006.

CHEN, Z. et al. Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering. **Materials Science and**

Engineering: C, v. 72, p. 341–351, mar. 2017.

Daneshmandi, L., & Laurencin, C. T. (2020). Regenerative engineered vascularized bone mediated by calcium peroxide. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 108(5), 1045-1057.

Doblaré, M., García, J. M., & Gómez, M. J. (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, 71(13-14), 1809-1840.

Dufrane, D. (2017). Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering. **Cell Transplantation**, 26(9), 1496-1504.

EMAMI, Asrin et al. Comparative assessment of the efficiency of various decellularization agents for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 109, n. 1, p. 19-32, 2021.

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, abr. 2015.

Geetha, Manivasagam, et al. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review. **Progress in materials science** 54.3 (2009): 397-425.

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.

Hanke, A., Bäumlein, M., Lang, S., Gueorguiev, B., Nerlich, M., Perren, T., ... & Loibl, M. (2017). Long-term radiographic appearance of calcium-phosphate synthetic bone grafts after surgical treatment of tibial plateau fractures. **Injury**, 48(12), 2807-2813.

HE, M. et al. Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 105, n. 6, p. 1352-1360, 2017.

HOLZAPFEL, Boris Michael et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

JADALANNAGARI, S. et al. Decellularized Wharton's Jelly from human umbilical cord as a novel 3D scaffolding material for tissue engineering applications. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172098, 21 fev. 2017.

KFOURY, Youmna; SCADDEN, David T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. **Cell stem cell**, v. 16, n. 3, p. 239-253, 2015.

Kurien, T., Pearson, R. G., & Scammell, B. E. (2013). Bone graft substitutes currently available in orthopaedic practice: the evidence for their use. **The bone & joint journal**, 95(5), 583-597.

KHAN, Ferdous; TANAKA, Masaru. Designing smart biomaterials for tissue engineering. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 17, 2017.

Lei, P., Sun, R., Wang, L., Zhou, J., Wan, L., Zhou, T., & Hu, Y. (2015). A new method for xenogeneic bone graft deproteinization: comparative study of radius defects in a rabbit model. **PLoS One**, 10(12), e0146005.

LEZIN, N.; WATKINS-CASTILLO, S. The impact of musculoskeletal disorders on Americans—opportunities for action. **The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States: Prevalence, Societal, and Economic Cost**, v. 3, 2016.

Malliappan, S. P., Yetisgin, A. A., Sahin, S. B., Demir, E., & Cetinel, S. Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds. **Carbohydrate polymers**, 119-142 (2022).

McGregor, D. B., et al. "Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies—a report of an IARC Monographs Programme Meeting." **European journal of cancer** 36.3 (2000): 307-313.

MORTADA, Ibrahim; MORTADA, Rola. Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. **European Journal of Medical Genetics**, v. 61, n. 2, p. 114-118, 2018.

NKENKE, Emeka; NEUKAM, Friedrich W. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. **Eur J Oral Implantol**, v. 7, n. Suppl 2, p. S203-S217, 2014.

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

ROOHANI, Iman et al. Emerging concepts in bone repair and the premise of soft materials. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 74, p. 220-229, 2022.

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

SCHECROUN, N.; DELLOYE, C. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous plasma. **Bone**, v. 35, n. 2, p. 517–524, ago. 2004.

SHRIVATS, Arun R.; MCDERMOTT, Michael C.; HOLLINGER, Jeffrey O. Bone tissue engineering: state of the union. **Drug discovery today**, v. 19, n. 6, p. 781-786, 2014.

Spin-Neto, R., Stavropoulos, A., Coletti, F. L., Faeda, R. S., Pereira, L. A. V. D., & Marcantonio Jr, E. (2014). Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation. **Clinical oral implants research**, 25(2), 226-233.

STACE, Edward T. et al. Translating regenerative biomaterials into clinical practice. **Journal of cellular physiology**, v. 231, n. 1, p. 36-49, 2016.

Steinemann, Samuel G. "Titanium—the material of choice?." **Periodontology** **2000** 17.1 (1998): 7-21.

World Health Organization. (2015). **World report on ageing and health**. World Health Organization.

WICHTERLE, Otto; LIM, Drahoslav. Hydrophilic gels for biological use. **Nature**, v. 185, n. 4706, p. 117-118, 1960.

Wapner, Keith L. "Implications of metallic corrosion in total knee arthroplasty." **Clinical Orthopaedics and Related Research®** 271 (1991): 12-20.

ZUK, Patricia A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

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