



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

FERNANDA MENDES COLOMBEKI

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE OSSO BOVINO
FETAL ENRIQUECIDO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

VITÓRIA, ES

2023

FERNANDA MENDES COLOMBEKI

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE OSSO BOVINO
FETAL ENRIQUECIDO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

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

M538d Mendes Colombeki, Fernanda, 1999-
DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE
OSSO BOVINO FETAL ENRIQUECIDO COM PLASMA
RICO EM PLAQUETAS / Fernanda Mendes Colombeki. - 2023.
60 f. : il.

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

1. Hidrogel. 2. . Osso bovino fetal. 3. Bioengenharia de
tecidos. 4. Células-tronco Mesenquimais. 5. Plasma Rico em
Plaquetas. I. Valentim Nogueira, Breno. 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 216ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente FERNANDA MENDES COLOMBEKI, realizada às 13:30h do dia 05 de abril de 2023, na sala de webconferência do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Dissertação intitulada “DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE OSSO BOVINO FETAL ENRIQUECIDO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS”. A sessão pública foi realizada em formato virtual, por meio do link <https://meet.google.com/bph-ryec-mou>. 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 a aluna que apresentou a sua proposta de dissertação. Terminada a apresentação, a banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda APROVADA 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, 05 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: 13/04/2023 16:33:22-0300
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 11/04/2023 às 21:48

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/688924?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 12/04/2023 às 20:38

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/689837?tipoArquivo=O>

FERNANDA MENDES COLOMBEKI

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL DERIVADO DE OSSO BOVINO
FETAL ENRIQUECIDO COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

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 05 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

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da sabedoria e por ter permitido tudo isso acontecer, sou imensamente grata.

Agradeço à minha família, que mesmo distantes (ou perto como a Júlia) sempre me apoiaram e me ajudaram a permanecer aqui e concluir esse trabalho.

Aos meus amigos de caminhada, sou muito grata por ter conhecido vocês. Thaís, Affonso, Ezio, Letícia e Layana, vocês tornaram esse período muito mais leve e divertido.

Em especial, aos Bioboners Thaís e Affonso que estiveram comigo desde o início. Obrigada Thaís por ter me acolhido e ter me ensinado absolutamente tudo sobre o hidrogel, e Affonso, obrigada por ter me ensinado absolutamente tudo sobre cultura de células. Agradeço também por todos os momentos compartilhados, na tristeza e na alegria, vocês sempre estiveram comigo.

Agradeço à minha amiga Isabella, que mesmo do outro lado do mundo sempre me apoiou e me ajudou bastante com os termos e resumo em inglês.

Agradeço ao Rodolpho por todo apoio durante a caminhada, todas as ideias e principalmente pela ajuda com o PRISMA nessa reta final.

Aos técnicos do LUCAR, Tadeu e Flávio, agradeço por todo apoio, por terem me ensinado a usar o Microscópio Eletrônico e por todos os momentos no almoço repletos de ideias e soluções. A ajuda de vocês foi essencial e agregou muito na minha jornada.

Agradeço ao meu orientador Breno Valentim, por ter me convidado para participar desse projeto sensacional, pela orientação e ajuda em todos os momentos que precisei.

Agradeço aos colegas do NBT, em especial ao meu ex-professor e agora colega, Gabriel Taufner, por toda a ajuda no início, esclarecimento de dúvidas e auxílio com as análises estatísticas. Agradeço à Suely que sempre esteve à disposição para nos auxiliar e preparando os melhores cafés para ajudar na energia extra.

Agradeço aos funcionários do CPID e LABIOM, que contribuíram para a realização de muitas análises feitas nesse projeto.

Agradeço a equipe do NGHM e a professora Flavia de Paula pelo fornecimento de células e materiais para as análises desse trabalho.

Agradeço ao professor Carlos Maranduba e professora Flavia de Paula, por terem aceitado participar dessa banca de mestrado e avaliar meu projeto.

Por fim, agradeço as agências de financiamento FAPES (Edital No 01/2020 - SPIN OFF; T.O. No 105/2021) CAPES e ao ICEPi.

“Você não pode ser atingido pelo raio se não permanecer na chuva.”

Vance Joy

RESUMO

COLOMBEKI, F.M. **Desenvolvimento de hidrogel derivado de osso bovino fetal enriquecido com plasma rico em plaquetas**. 2023. 56p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O hidrogel derivado de matriz extracelular bovina fetal é um polímero que apresenta características semelhantes aos tecidos de cicatrização óssea, podendo ser estudado para desenvolver um veículo de entrega de fatores de crescimento e de suporte mecânico para as células de modo eficaz. O plasma rico em plaquetas (PRP) é empregado em diversas pesquisas relacionadas a regeneração óssea, visto que, é uma fonte inestimável de fatores de crescimento. A aplicação dessa substância ao hidrogel permite que ele seja aprimorado e potencialize os efeitos sobre a cicatrização óssea. O propósito deste estudo foi desenvolver hidrogel derivado de osso bovino fetal enriquecido com PRP e avaliar os efeitos desse biomaterial *in vitro*. Para essa finalidade, foi utilizado protocolo de descelularização dos ossos fetais, seguido pela digestão, solubilização e gelificação da matriz óssea. Para avaliar a eficiência do processo de descelularização, foram feitas análises de detergente residual, quantificação de DNA e hidroxiprolina. Os hidrogéis obtidos foram avaliados quanto a ultraestrutura na microscopia eletrônica de varredura. Para verificar o efeito de diferentes concentrações de plasma rico em plaquetas no hidrogel, foi realizado o ensaio de proliferação celular. Os resultados revelaram que a descelularização foi eficaz no osso fetal bovino e manteve os componentes da matriz extracelular óssea, como o colágeno. Os níveis de detergente residual foram reduzidos de acordo com os processos de lavagens e diluições. Demonstrou também que as concentrações aplicadas de PRP, apresentaram níveis de crescimento celular progressivos quando comparadas às células-tronco mesenquimais cultivadas em hidrogel puro. Diante disso, o hidrogel enriquecido mostrou-se promissor para ser utilizado como um veículo de entrega de fatores de crescimento para as células, podendo ser usado futuramente em estudos que visem potencializar a cicatrização óssea.

Palavras-chave: Hidrogel. Osso bovino fetal. Bioengenharia de tecidos. Células-tronco Mesenquimais. Plasma Rico em Plaquetas.

ABSTRACT

COLOMBEKI, F.M. **Development of hydrogel derived from fetal bovine bone enriched with platelet-rich plasma.** 2023. 56p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The hydrogel derived from bovine extracellular matrix is a polymer that has similar characteristics to bone healing tissues, and can be thought to develop a vehicle for delivering growth factors and mechanical support to cells effectively. Platelet-rich plasma (PRP) is used in several studies related to bone identification, since it is an invaluable source of growth factors. The application of this substance to the hydrogel allows it to be improved and potentiate the effects on bone healing. The aim of this study was to develop a hydrogel derived from fetal bovine bone enriched with PRP and to evaluate the effects of this biomaterial *in vitro*. For this purpose, the fetal bone decellularization protocol was used, followed by digestion, solubilization and gelation of the bone matrix. To evaluate the efficiency of the decellularization process, analyzes of residual detergent, DNA quantification and hydroxyproline were performed. The obtained hydrogels were evaluated for ultrastructure in scanning electron microscopy. To verify the effect of different concentrations of platelet-rich plasma on the hydrogel, the regional cell assay was performed. The results revealed that decellularization was effective in bovine fetal bone and maintained bone extracellular matrix components such as collagen. Residual detergent levels were reduced according to washing and dilution processes. It also demonstrated that the applied concentrations of PRP followed progressive cell growth levels when detected in mesenchymal stem cells cultured in pure hydrogel. In view of this, the enriched hydrogel has shown promise to be used as a vehicle for delivering growth factors to cells, and may be used in future studies aimed at enhancing bone healing.

Key-Words: Hydrogel. Fetal bovine bone. Tissue bioengineering. Mesenchymal stem cells. Platelet Rich Plasma.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Blocos de osso fetal in natura (A), bloco de osso fetal descelularizado (B), osso fetal moído descelularizado e desmineralizado (C), hidrogel fetal (D), hidrogel fetal enriquecido com 10% de PRP (E) e hidrogel fetal enriquecido com 20% de PRP (F).....36
- Figura 2:** Curva padrão de SDS confeccionada com concentrações entre 0,25% e 0,01%. $R=0,989$37
- Figura 3:** Detergente residual em amostras de osso fetal em Grânulo (n=4), Mariz Digerida (n=4) e Hidrogel Fetal (n=4). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p<0,05$ grânulo vs hidrogel; # $p<0,05$ grânulo vs matriz; † $p<0,05$ matriz vs hidrogel; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.37
- Figura 4:** Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco dos diferentes grupos. Fetal Controle (FC, n=8), Fetal Descelularizado (FD, n=8) e Hidrogel Fetal (HF, n=8). Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p<0,05$ fetal descelularizado vs fetal controle; # $p<0,05$ hidrogel fetal vs fetal descelularizado. 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.....38
- Figura 5:** Curva padrão de hidroxiprolina confeccionada com concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL39
- Figura 6:** Concentração de hidroxiprolina por mL de tecido digerido. Osso fetal controle descelularizado (CF, n=4) e Osso Fetal in natura (OF, n=4). Os dados estão expressos em média \pm EPM. Teste t não pareado).....40
- Figura 7:** Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos hidrogel de MEC óssea fetal pura (A, B e C), hidrogel enriquecido com 10% de PRP (D, E e F), 20% de PRP (G, H e I) e o PRP liofilizado (J, K e L). Barra de escala: A, D, G e J: 100 μ m, B, E, H e K: 100 μ m e C, F, I e L: 10 μ m. Com 100x, 200x, 1.000x de magnificação, respectivamente41
- Figura 8:** Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 100 μ m, B: 50 μ m. Aumento de 100x e 200x, respectivamente.42

Figura 9: Avaliação da proliferação celular por MTT após 3 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$ controle vs 10%; # $p < 0,05$ 10% vs 20%; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.43

Figura 10: Avaliação de proliferação celular por MTT após 3, 6 e 9 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$ controle vs 10% e 20%; # $p < 0,05$ 10% vs 20%; † $p < 0,05$ 10% vs 20%; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

CCS-UFES - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CNS - Conselho Nacional de Saúde

CPID - Centro de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento

CTM's - Células-Tronco Mesenquimais

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético

FAPES - Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo

FC - Fetal Controle

FD - Fetal Descelularizado

H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico

HCl - Ácido Clorídrico

HF - Hidrogel Fetal

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 da UFES

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

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão Fosfato De Sódio

PDGF- BB - Fatores de crescimento derivados de plaquetas

PG's - Proteoglicanos

PGFs - Fatores de crescimento de plaquetas

pH - Potencial Hidrogeniônico

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

SDS - Dodecil Sulfato De Sódio

SFB - Soro Fetal Bovino

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

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

Tris-HCl - Tris Hidroximetil Aminometano Cloridrato (HCl)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS E BIOMATERIAIS	17
2.1.1	Hidrogéis	19
2.1.2	Biomateriais à base de hidrogel	20
2.1.3	Biomateriais à base de MEC	21
2.2	BIOMATERIAIS NA CULTURA DE CÉLULAS	21
2.3	PLASMA RICO EM PLAQUETAS	22
2.3.1	Fatores de crescimento	23
3	JUSTIFICATIVA	25
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5	MATERIAS E MÉTODOS	28
5.1	COLETA DO MATERIAL	28
5.2	DESCELULARIZAÇÃO	28
5.3	PRODUÇÃO DO HIDROGEL	29
5.3.1	Incorporação do PRP e gelificação	30
5.4	AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO	30
5.4.1	Quantificação de DNA	30
5.4.2	Avaliação de SDS residual	31
5.4.3	Quantificação de colágeno	32
5.5	ANÁLISE DE BIOCMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS	33

5.5.1	Cultivo de células-tronco mesenquimais	33
5.5.2	Avaliação da atividade metabólica celular	34
5.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	35
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
6	RESULTADOS	36
6.1	AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO E FORMAÇÃO DO HIDROGEL ..	36
6.1.1	Aspecto visual do osso descelularizado e produção do hidrogel...	36
6.1.2	Quantificação de SDS residual.....	37
6.1.3	Quantificação de DNA	38
6.1.4	Análise de hidroxiprolina	39
6.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	40
6.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	41
6.3.1	Cultivo de células-tronco mesenquimais	42
6.3.2	Proliferação celular	42
7	DISCUSSÃO	45
8	CONCLUSÃO.....	50
9	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos podem ser gerados a partir de doenças degenerativas, infecções graves, traumas e excisão de tumores (SAWKINS *et al.*, 2013). A frequência de danos e distúrbios ósseos acidentais está aumentando em todo o mundo, além disso, à medida que o percentual da população idosa cresce, resulta em um aumento do número de doenças ósseas (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017) e por conta de fatores fisiológicos de uma pessoa senil, não permite uma cicatrização adequada (SAWKINS *et al.*, 2013). Este aumento impulsiona a necessidade de implantes ósseos artificiais que empregam especificamente materiais biocompatíveis (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017).

As opções atuais de tratamento envolvem enxerto ósseo autólogo e este é considerado padrão ouro com o melhor resultado clínico, entretanto, possui limitações significativas que incluem disponibilidade restrita de tecido doador e morbidade no local da coleta tecidual (SAWKINS *et al.*, 2013).

Substitutos de enxerto ósseo, como matriz óssea desmineralizada, foram desenvolvidos para superar as limitações de autoenxertos e aloenxertos. Para facilitar o manuseio, formulação e entrega confiável clinicamente, essas partículas são geralmente incorporadas em um transportador. Esses biomateriais têm propriedades estruturais, mecânicas e biológicas distintas, possuindo alto potencial para entrega clínica (SAWKINS *et al.*, 2013). Algumas pesquisas foram realizadas para demonstrar a atividade do PRP combinado com biomateriais para promover a regeneração óssea e obtiveram resultados satisfatórios no quesito de proliferação celular (HOKUGO *et al.*, 2005).

Novos procedimentos para reconstrução óssea sugerem que células autólogas semeadas em um *scaffold* reabsorvível podem melhorar o tratamento de defeitos ósseos, sendo importante desenvolver condições de cultura para expansão *ex vivo* de células-tronco mesenquimais (CTM's) que não comprometam sua capacidade de autorrenovação, dessa forma, elas irão obter um número apropriado de células e podem ser estimuladas a se diferenciar em linhagens do tecido mesenquimal, incluindo o tecido ósseo (HOKUGO *et al.*, 2005). Portanto, as CTM's oferecem uma

grande promessa para a medicina regenerativa baseada em células (LUCARELLI *et al.*, 2003).

As aplicações clínicas humanas do PRP são amplamente difundidas. Essa substância é caracterizada como um concentrado derivado do sangue com elevado número de plaquetas e pode ser produzido por centrifugação ou aférese (LANG *et al.*, 2018). As plaquetas são uma fonte facilmente acessível de fatores de crescimento (LUCARELLI *et al.*, 2003) e está clinicamente disponível para aplicações terapêuticas em feridas cutâneas, possuindo grânulos secretores especializados nas plaquetas (HOKUGO *et al.*, 2005).

Os fatores de crescimento mais relevantes são o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (LANG *et al.*, 2018). Esses fatores de crescimento são liberados quando as plaquetas são ativadas por um estímulo ou agregados por alguns ativadores. Dentre eles, o TGF- β e o PDGF promovem a cicatrização de tecidos moles e ósseos por meio da estimulação da produção de colágeno, para melhorar a resistência da ferida e o início da cicatrização (HOKUGO *et al.*, 2005).

Várias técnicas têm sido utilizadas para estimular a regeneração de tecidos duros ou moles. Atualmente há um grande esforço no uso de biológicos como mediadores-chave da regeneração tecidual e um dos grandes enfoques é a regeneração através do PRP (HOKUGO *et al.*, 2005) e suas aplicações em engenharia de tecidos no contexto de reparo de ossos, cartilagens, pele e tecidos moles, com a entrega de fatores de crescimento, muitas vezes em combinação com biomateriais (LANG *et al.*, 2018).

As CTM's são empregadas em estudos pré-clínicos para regeneração óssea em defeitos ósseos maciços que o corpo não pode reparar naturalmente. Para serem usadas, precisam ser expandidas para pelo menos milhões de células e isso pode ser feito através da exposição aos fatores de crescimento das plaquetas (LUCARELLI *et al.*, 2003).

Entretanto, esse material deve ser entregue em um suporte de composição adequada, e uma opção viável para isso, é a utilização de hidrogéis. A matriz extracelular (MEC) de tecidos de mamíferos pode ser isolada, descelularizada e utilizada como suporte

biológico para esses fins, gerando uma remodelação construtiva através do recrutamento de células progenitoras, promoção da proliferação celular e angiogênese regional (SAWKINS *et al.*, 2013).

Embora esses materiais biológicos derivados de tecidos tenham sido usados com sucesso em locais não homólogos, estudos recentes demonstraram uma "especificidade tecidual", com a ocorrência de funções adicionais e formação de tecidos complexos quando os *scaffolds* biológicos foram derivados de tecidos homólogos sítio-específicos (SAWKINS *et al.*, 2013).

As células da medula no material de enxerto que abrigam receptores para os fatores de crescimento, demonstraram melhorar a taxa de formação óssea e a densidade do osso formado (LUCARELLI *et al.*, 2003).

Sendo assim, é necessário estudar o efeito dos fatores de crescimento do PRP aplicado juntamente a um hidrogel de matriz óssea bovina na proliferação de CTM's, a fim de auxiliar futuramente em testes na bioengenharia tecidual, que visem promover cicatrização óssea de maneira eficiente e segura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENGENHARIA DE TECIDOS ÓSSEOS E BIOMATERIAIS

Defeitos ósseos de tamanho crítico geralmente causados por trauma, acidente, tumor, osteoartrite e osteonecrose, destroem o sistema musculoesquelético, resultando em disfunções humanas. Continua sendo um desafio regenerar defeitos ósseos no cenário clínico (DING *et al.*, 2021).

Três tipos de enxertos ósseos, incluindo autoenxertos, aloenxertos e substitutos de enxerto ósseo, têm sido usados clinicamente para acelerar o reparo. Devido à limitação do fornecimento de autoenxertos, risco de resposta imune de aloenxertos e capacidade osteogênica insuficiente dos substitutos ósseos, a engenharia de tecidos surge como uma próspera alternativa (DING *et al.*, 2021).

Embora tais transplantes de aloenxertos apresentem riscos de rejeição e outras complicações, a principal desvantagem é o número limitado de órgãos disponíveis e a adequação dos receptores (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019). De acordo com a definição de engenharia de tecidos descrita em um *workshop* da Fundação Nacional de Ciência, os *scaffolds* são os melhores materiais para restaurar, manter e melhorar a função do tecido (CHAUDHARI *et al.*, 2016), concentrando-se na regeneração, em vez de substituí-los, restaurando e melhorando as suas funções (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Aproximadamente dois milhões de procedimentos de enxerto ósseo são realizados internacionalmente todos os anos na coluna, osso pélvico e outras extremidades do corpo. No entanto, 50% dos implantes, tanto autógenos quanto aloenxertos, falham rapidamente. A alta incidência de distúrbios e doenças relacionadas aos ossos e articulações, como osteoporose, artrite, obesidade, diabetes e câncer, causa lesões nos tecidos ósseos e afetam a saúde e o desempenho do esqueleto humano (KIM *et al.*, 2017).

Para uma regeneração óssea adequada, os *scaffolds* ósseos precisam ser rígidos o suficiente para suportar a resistência mecânica e a pressão. Além disso, a composição deve consistir em materiais biocompatíveis que ocasionem inflamação mínima do tecido do hospedeiro. Também é importante que imite a configuração do tecido ósseo

natural no qual as células progenitoras se comprometem com uma linhagem osteogênica em um microambiente semelhante ao osso (KIM *et al.*, 2017).

Os *scaffolds* desempenham um papel único na reparação, fornecendo plataforma adequada, permitindo o fornecimento essencial de vários fatores associados à sobrevivência, proliferação e diferenciação das células. Para aplicações de engenharia de tecidos, os biomateriais geralmente servem como suporte para um tipo de célula específico. Além disso, deve se integrar mecanicamente e fisiologicamente ao tecido de reparo, ou deve ser degradado sem deixar lacunas ou fissuras no tecido que encapsula as CTM's (DEBNATH *et al.*, 2016).

A MEC de tecidos de mamíferos pode ser isolada, descelularizada e utilizada como suporte biológico (SAWKINS *et al.*, 2013), uma vez que a estrutura porosa é característica distintiva do tecido ósseo natural, projetos de *scaffolds* adicionais que incluem uma estrutura de microporos, podem fornecer um benefício adicional às células semeadas em condições de crescimento favoráveis, migração de células hospedeiras e diferenciação osteogênica aprimorada (KIM *et al.*, 2017).

Substitutos de enxerto ósseo, como matriz óssea descelularizada e desmineralizada, foram desenvolvidos para superar as limitações de autoenxertos e aloenxertos. As deficiências dos aloenxertos incluem questões de processamento, esterilização, transmissão de doenças e potencial resposta imunogênica, com altas taxas de fraturas e complicações, atribuídas à sua capacidade limitada de revascularizar e remodelar (SAWKINS *et al.*, 2013).

A matriz óssea bovina fetal é similar com as matrizes ósseas presentes nas zonas de crescimento e nos calos ósseos formados em áreas de cicatrização de fraturas, apresentando características singulares que se diferenciam daquelas observadas na MEC adulta (BULLARD; LORENZ, 2003; SWANSON; VIVIAN, 1997).

Observações clínicas e análises experimentais sugerem que a cicatrização de feridas em tecidos fetais é diferente quando comparados a tecidos adultos, portanto, uma compreensão da biologia da matriz óssea fetal tem um grande potencial para estudos na regeneração de feridas e aplicações clínicas (LONGAKER *et al.*, 1991).

2.1.1 Hidrogéis

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos que podem absorver até milhares de vezes o seu peso seco em água. Podem ser quimicamente estáveis ou dissolver. Sua capacidade de absorver água se deve a grupos hidrofílicos acoplados ao polímero e sua resistência à dissolução e à reticulação entre as cadeias poliméricas (AMARAL, 2018).

Têm sido investigados como potenciais candidatos para estudar a migração e proliferação de CTM's, tornando-se uma opção promissora para a bioengenharia de tecidos, pois ao mesmo tempo podem ser utilizados como suporte para o crescimento celular e para a liberação de moléculas moduladoras da MEC (HUANG *et al.*, 2016).

Suas propriedades finais podem ser prontamente ajustadas para conter pistas e gatilhos para adesão e função celular (incluindo migração, proliferação e diferenciação), bem como ajustar as propriedades mecânicas e de degradação dos materiais (HUANG *et al.*, 2016). De maneira geral, a estrutura dos hidrogéis, mimetizam a estrutura de tecidos, tornando-os propícios para a acomodação de células e liberação de substâncias solúveis (AMARAL, 2018).

Os hidrogéis podem ser classificados ainda de acordo com sua origem em sintéticos e naturais (AHMED, 2015). Dentre os hidrogéis sintéticos pode-se citar poliácido acrílico, polietileno glicol, poli álcool vinil, poliacrilamida e polipeptídeos (CRUZ-ACUÑA e GARCÍA, 2017).

Esses materiais podem fornecer suporte mecânico para vários tipos de células. No entanto, carecem de fatores endógenos essenciais para o comportamento celular e atuam principalmente como local de suporte para permitir a função celular. Assim, hidrogéis sintéticos precisam de modificação com componentes biológicos adequados para promover sinais de função nas células (PARK *et al.*, 2021).

Os hidrogéis naturais são compostos de substâncias como colágeno, alginato, ácido hialurônico e outros que promovem várias funções celulares com uma variedade de fatores endógenos presentes, que podem beneficiar a viabilidade, proliferação e diferenciação de muitos tipos de células. No entanto, devido à complexidade e

natureza indefinida desses hidrogéis, é difícil determinar com muita precisão quais sinais promovem na função celular (PARK *et al.*, 2021).

2.1.2 Biomateriais à base de hidrogel

São compostos por macromoléculas naturais ou polímeros sintéticos e possuem um grande potencial devido à sua natureza biocompatível, biodegradável e sua capacidade de interação celular intrínseca (CHAUDHARI *et al.*, 2016).

Uma das principais características na formação de hidrogel é que os biomateriais usados, devem ser capazes de formar uma rede de malha polimérica sólida sob a influência de vários fatores, como pH e temperatura. A biocompatibilidade dos hidrogéis é atribuída à sua semelhança com os componentes macromoleculares do corpo (CHAUDHARI *et al.*, 2016).

Os hidrogéis são formados através de ligações cruzadas covalentes ou não covalentes de polímeros. Um equilíbrio entre a adesão das células ao *scaffold* e as taxas de degradação do hidrogel são fatores essenciais para promover a formação de novos tecidos (CHAUDHARI *et al.*, 2016).

Várias hipóteses foram sugeridas, incluindo a possibilidade de que a arquitetura do hidrogel gelificado compreende um tamanho de poro e diâmetro de fibra adequado para infiltração de células endógenas. Além disso, o hidrogel fornece sinalizações específicas do tecido, provavelmente através da liberação de fatores de crescimento ligados, a criação de peptídeos crípticos ou a exposição de bioativos (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Portanto, um *scaffold* de hidrogel ideal deve ter excelente comportamento de degradação, bem como características bem definidas, reprodutíveis e ajustáveis, para que possa ser utilizado em diversas aplicações, como cicatrização de feridas, diferenciação celular e angiogênese (CHAUDHARI *et al.*, 2016), que é crucial no processo de regeneração óssea. Além do transporte de nutrientes e do recrutamento de diferentes células, a angiogênese nos defeitos ósseos influencia o comportamento celular e as moléculas sinalizadoras envolvidas na regeneração óssea (DING *et al.*, 2021).

2.1.3 Biomateriais à base de MEC

Os biomateriais à base de MEC são derivados de tecidos descelularizados e têm sido amplamente explorados para regeneração de tecidos *in situ*, devido ao fato de fornecerem um ambiente muito semelhante ao da MEC de tecido nativo, especialmente no que diz respeito ao comportamento celular (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019). Estudos anteriores sugeriram que *scaffolds* biológicos derivados de tecidos homólogos, tinham função superior e eram mais adequados para reparo tecidual em comparação com *scaffolds* derivados de tecidos não homólogos (ALOM *et al.*, 2017).

O colágeno é uma das proteínas abundantemente presentes na MEC. Esse composto possui propriedades e características semelhantes a tecidos nativos. Assim, o colágeno pode ser usado para criar géis para cultura de células (PARK *et al.*, 2021). A formação de hidrogel é um processo de auto-montagem baseado em colágeno que é regulado em parte pela presença de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas da matriz (SALDIN *et al.*, 2016), portanto, o processo de descelularização deve obter a remoção suficiente de células dos tecidos de origem (SALDIN *et al.*, 2016) mas preservando a integridade estrutural da matriz (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Os determinantes críticos da regeneração óssea incluem MEC, respostas imunes e angiogênese. A matriz poderia regular o processo de mineralização, pois fornece pistas mecânicas para induzir a diferenciação osteoblástica e a formação de osso maduro. A angiogênese é crucial no processo de regeneração óssea. Além do transporte de nutrientes e do recrutamento de diferentes células, também influencia o comportamento celular e as moléculas sinalizadoras envolvidas na regeneração óssea (DING *et al.*, 2021).

2.2 BIOMATERIAIS NA CULTURA DE CÉLULAS

Por muito tempo, a cultura de células bidimensionais (2D) foi realizada em placas de poços planos amplamente disponíveis para imitar o corpo humano. No entanto, em um sistema de cultura 2D, as células se espalham nas superfícies planas e duras e proliferam de forma não natural. Há uma diferença na morfologia celular, funções e comportamento geral, portanto, a cultura de células deve ser adaptada para refletir melhor o ambiente natural (PARK *et al.*, 2021).

Durante a regeneração tecidual *in situ*, um suporte de biomaterial específico do tecido, sozinho ou em combinação com fatores de crescimento, é implantado no local do tecido danificado (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

As células do ambiente natural estão inseridas na MEC, formando uma complexa estrutura tridimensional (3D). A MEC desempenha o papel de regular as interações entre células, adesão celular, diferenciação e crescimento. Espera-se que o biomaterial ocupe totalmente a anatomia do local do defeito, forneça um microambiente instrutivo para promover e recrutar CTM's hospedeiras *in vivo*, fornecer estimulantes para desencadear cascatas de cura nativas, promover a diferenciação e a proliferação celular (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

Sendo assim, uma compreensão da composição e estrutura do biomaterial é fundamental para o desenvolvimento de novas culturas 3D e prever mecanismos biológicos com efeitos terapêuticos (PARK *et al.*, 2021). Em particular, as células cultivadas em um microambiente 3D com componentes da MEC, mostraram morfologia realista e expressaram vários genes que não foram expressos em uma cultura 2D. Além disso, essas células sintetizam MEC como fazem *in vivo* para regeneração (PARK *et al.*, 2021).

A matriz também fornece suporte estrutural até que o novo tecido seja formado sem a necessidade de manipulação complicada *in vitro*. O resultado terapêutico do uso do biomaterial para a regeneração tecidual *in situ* depende, portanto, do *homing* celular eficaz e do controle do destino celular (ABDULGHANI; MITCHELL, 2019).

2.3 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O PRP é um concentrado derivado do sangue com elevado número de plaquetas e pode ser produzido por centrifugação ou aférese. Após a centrifugação do sangue total, uma camada distinta de glóbulos vermelhos e uma camada de plasma podem ser distinguidas. Entre essas camadas, encontra-se a chamada *buffy coat*, que contém a maior parte dos glóbulos brancos e plaquetas, que é então utilizada para a preparação do PRP. Em alguns protocolos, uma segunda etapa de centrifugação da camada leucocitária/plasma é usada para obter um produto PRP mais purificado e concentrado (LANG *et al.*, 2018).

As terapias de PRP têm sido usadas para várias indicações há mais de 30 anos, resultando em um interesse considerável no potencial do PRP autólogo na medicina regenerativa. Atualmente, as terapias de PRP são opções de tratamento adequadas com benefícios clínicos, no entanto, inconsistências nos resultados dos pacientes e novos *insights* desafiaram a praticidade das aplicações clínicas do PRP. Uma razão pode ser o grande número e variabilidade de sistemas PRP e semelhantes comercialmente disponíveis (EVERTS *et al.*, 2020).

Esses dispositivos variam em volumes de coleta de PRP, protocolos de preparação que resultam em propriedades distintas de PRP e bioformulações. Além disso, a falta de consenso sobre a padronização dos protocolos de preparação do PRP, com relato adequado de bioformulações em aplicações clínicas, contribui para inconsistências nos resultados relatados (EVERTS *et al.*, 2020).

Os focos principal das pesquisas realizadas, são a função plaquetária e o modo de ação, o efeito do PRP nos vários estágios da cascata de cicatrização e o papel central dos fatores de crescimento derivados de plaquetas em várias indicações do PRP (EVERTS *et al.*, 2020).

2.3.1 Fatores de crescimento

As plaquetas são uma fonte facilmente acessível de fatores de crescimento para apoiar a cicatrização óssea e de tecidos moles (LUCARELLI *et al.*, 2003). Dentre eles, os mais relevantes que estão contidos nos grânulos α das plaquetas são o TGF- β e o PDGF (LANG *et al.*, 2018).

As funções desses fatores de crescimento estão relacionadas com os índices mitogênicos, a capacidade de promover a síntese de colágeno, estimulação das CTM's indiferenciadas e outros efeitos favoráveis e benéficos (EVERTS *et al.*, 2020).

Estes fatores promovem a cicatrização de tecidos moles e ósseos por meio da estimulação da produção de colágeno para melhorar a resistência da ferida e o início da cicatrização. Assim, se os fatores de crescimento plaquetários forem efetivos no tecido da ferida, pode-se esperar uma aceleração da cicatrização. (HOKUGO *et al.*, 2005).

Tal aplicação de plaquetas começou no campo da odontologia (HOKUGO *et al.*, 2005), em particular em cirurgia bucomaxilofacial, onde tem uma eficácia documentada na aceleração da cicatrização de enxertos ósseos autógenos. A ação dos fatores de crescimento no material de enxerto reduz significativamente o tempo necessário para promover a consolidação, maturação e densidade óssea (LUCARELLI *et al.*, 2003).

Outros estudos evidenciam que a liberação dos fatores de crescimento pelas plaquetas contidas no PRP, pode favorecer a reparação das lesões e possibilitar o mais rápido retorno à funcionalidade, possivelmente por estimular a neovascularização, que melhora o suprimento sanguíneo e disponibiliza nutrientes necessários à regeneração tecidual (SOUZA *et al.*, 2014).

Em todos os estágios do processo de reparo tecidual, uma ampla variedade de fatores de crescimento, citocinas e reguladores de ação local contribuem para as funções celulares mais básicas por meio de mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos (EVERTS *et al.*, 2020). Uma vantagem do PRP inclui sua segurança e as técnicas engenhosas de preparação dos dispositivos comerciais atuais para preparar um material biológico que pode ser usado em um amplo perfil de aplicação (EVERTS *et al.*, 2020).

Existem muitas maneiras possíveis de ativar o PRP, o que implica induzir a liberação de moléculas bioativas das plaquetas e a clivagem do fibrinogênio. Mais comumente, trombina e cloreto de cálcio são usados para esta finalidade. Uma vez ativado, o PRP eventualmente formará um gel, que foi relatado como secretor de fatores de crescimento e pode ser aplicado como veículo de entrega para células (LANG *et al.*, 2018).

É ressaltado a importância de desenvolver condições de cultura para expansão de CTM's que não comprometam sua capacidade de autorrenovação e diferenciação. Uma combinação com o gel de plaquetas obtido por PRP, fornece uma fonte inestimável de fatores de crescimento para reconstrução óssea (LANG *et al.*, 2018).

A busca por biomateriais apropriados é necessária para melhorar a função biológica do PRP, no entanto, pouco tem sido feito para investigar a função biológica dessa

substância do ponto de vista da combinação com biomateriais (HOKUGO *et al.*, 2005).

3 JUSTIFICATIVA

Através da demanda clínica existente sobre biomateriais ósseos compatíveis e eficientes, este estudo apresenta inovação com o uso de hidrogéis derivados de osso

bovino fetal enriquecido com PRP, sendo um biomaterial promissor para futuras aplicações na engenharia de tecidos.

O PRP é uma fonte abundante de fatores de crescimento com funcionalidades que são aplicadas à reparação tecidual óssea, portanto, a partir dessa pesquisa, é possível que se tenha uma percepção elaborada da relação entre biomateriais e PRP, bem como o comportamento das células diante dos fatores de crescimento através da cultura celular, visto que a biocompatibilidade do *scaffold* é importante para futuras aplicações clínicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver hidrogel derivado de matriz óssea bovina fetal enriquecido com plasma rico em plaquetas e avaliar seu potencial biológico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descelularizar ossos bovinos fetais para a produção de hidrogel.
2. Verificar eficácia do processo de descelularização.
3. Produzir hidrogel de matriz óssea bovina com adição de PRP.
4. Avaliar a biocompatibilidade e os efeitos de diferentes concentrações de PRP *in vitro*.
5. Avaliar a proliferação celular com hidrogéis enriquecidos.

5 MATERIAS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Núcleo de Bioengenharia Tecidual (NBT), com sede no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (CCS-UFES) bem como 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). O projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) edital Nº 01/2020 – Projetos Inovadores e Spin-Off: T.O. 105/2021.

5.1 COLETA DO MATERIAL

Após o abate de fêmeas gestantes em abatedouro frigorífico (Frigorífico Cariacica S.A – MAFRICAL, Cariacica - ES), foram coletados os ossos de fetos bovinos, com idade gestacional entre sete e oito meses de desenvolvimento, que se tornariam resíduos e seriam descartados. O frigorífico é 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 de aproximadamente 2,0 a 3,0cm de diâmetro e 0,5cm de espessura. Esses blocos foram acondicionados em sacos plásticos e armazenados em caixas térmicas contendo gelo, e transportados até o NBT, onde foram limpos e dessecados.

A seleção dos blocos foi preferencialmente por ossos esponjosos que mais se aproximavam à medida desejada (2,0 a 3,0cm de diâmetro e 0,5cm de espessura). Após a seleção, todos os fragmentos ósseos foram lavados em água corrente e distribuídos em frascos de 500mL contendo aproximadamente 50 gramas de blocos de ossos em cada frasco.

5.2 DESCELULARIZAÇÃO

O processo de descelularização foi realizado de acordo com o protocolo padrão do registro de patente BR1020180037269 “Biomaterial de osso descelularizado enriquecido com hidrogel de matriz extracelular óssea descelularizada”.

Essa etapa ocorreu no CPDI, onde os blocos de ossos fetais foram lavados por imersão com aproximadamente 400mL de solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) 0,4% e Deodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1%, sob agitação contínua por 96 horas. As soluções foram trocadas a cada 12 horas.

Para finalizar o 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. Em seguida, o material foi submetido a uma solução clareadora contendo 35% de Peróxido de Hidrogênio bem como duas lavagens de PBS (1x) por 30 minutos cada, ambas sob agitação.

Após as lavagens, os ossos foram levados ao NBT para secagem em estufa a 37°C e moídos em um moinho de lâminas circulares (10 lâminas de 184mm) com granulometria de 0,5 - 2 cm. Operado com motor trifásico de indução tipo rotor de gaiola, com potência de 0.75 kW/1 HP-cv e 60 HZ de frequência.

5.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL

A partir do processo de moagem, os ossos passaram por um processo de desmineralização para retirada dos minerais. Essa etapa é realizada com HCl (0,5M) a uma concentração de 25mL/g de osso durante 24 horas.

Em seguida, o osso passou por uma lavagem com ácido peracético 0,2% e após essa etapa, 10 lavagens de 15 minutos cada com água destilada na concentração de 100 mL/g, seguida de 2 lavagens com PBS (1x) estéril na mesma concentração. Após lavados, foram liofilizados e armazenados a - 80°C até o uso.

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

O processo de gelificação foi realizado adicionando 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 temperatura de 4°C).

5.3.1 Incorporação do PRP e gelificação

As bolsas de PRP foram adquiridas através de doação realizada pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes – HUCAM (amostras que seriam descartadas pela instituição), onde foram armazenadas a -80°C até o uso. Conforme a resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), a utilização do PRP doado foi isenta de aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa, já que não foram realizados testes, medições ou experimentos diretamente em seres humanos nesse projeto.

O processo de ativação plaquetária do PRP foi realizado de acordo com o protocolo de Lucarelli *et al.* (2003) e Siegmund *et al.* (2018) com algumas adaptações. Adicionou-se $330\mu\text{L}$ de Cloreto de Cálcio (100mg/mL) a 10mL PRP para ocorrer a ativação plaquetária. Em seguida, realizou-se a incorporação ao hidrogel.

A concentração de PRP ativado foi através de um percentual estabelecido para esse estudo. O percentual avaliado foi de 10% e 20%. Em seguida, o pré-gel com o PRP foi colocado a 37°C por 1 hora para a gelificar.

5.4 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO

5.4.1 Quantificação de DNA

Para essa análise, foi utilizado o protocolo de extração salina do estudo de Hanotte *et al.* (1992), adaptado por David Vieites - U.C. Berkeley.

As amostras de ossos fetais descelularizados (FD, $n=8$) e fetal controle (FC, $n=8$) foram alocadas em microtubos de 2mL estéreis contendo solução de lise composta por $410\mu\text{L}$ de buffer de extração ($0,2\text{mL}$ Tris 1M pH 8 / $0,4\text{mL}$ NaCl 5M / $0,4\text{mL}$ EDTA $0,5\text{M}$ pH 8 / 19mL de água ultrapura), $80\mu\text{L}$ de SDS à 10% e $15\mu\text{L}$ de proteinase K ($20\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Posteriormente, os tubos foram incubados a 55°C *overnight* e em seguida, centrifugados a 13.700 rpm por 5 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos e adicionou-se $180\mu\text{L}$ de NaCl 5M . As amostras foram homogeneizadas até a formação de um precipitado de cor branca. Os tubos foram novamente

centrifugados a 13.700rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para novos microtubos e foram adicionados 800µL de isopropanol gelado.

Os microtubos foram homogeneizados e centrifugados a 13.700rpm, desta vez por 7 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado. No tubo remanescente, adicionou-se 250µL de etanol a 80% e homogeneizado suavemente. Os microtubos foram centrifugados a 13.700rpm por mais 7 minutos e novamente foram adicionados 250µL de etanol a 80% e homogeneizados novamente. Realizou-se outra vez a centrifugação dos microtubos a 13.700rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. Para a evaporação do etanol residual, o material foi exposto a 55°C por 30 minutos em estufa estéril.

O DNA contido nos microtubos das amostras foi suspenso em 50µL de água ultrapura e mantidos *overnight* em geladeira a 4°C para diluição. Para finalizar, 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.

5.4.2 Avaliação de 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).

5.4.3 Quantificação de colágeno

Foi utilizado o teor do aminoácido hidroxiprolina através do protocolo adaptado de métodos descritos por Edwards; O'brien (1980) e Reedy; Enwemeka (1996) por espectrofotometria. Nessa análise, utilizou-se os ossos fetais moídos *in natura* e os ossos descelularizados.

Inicialmente, as amostras de tecido foram pesadas e acondicionadas em tubos de 15mL contendo 50µL de hidróxido de sódio (7N) para ocorrer a hidrólise alcalina. Como branco, foi utilizado um tubo contendo apenas 50µL de hidróxido de sódio, que foi submetido a todas as etapas do processamento. Os tubos foram autoclavados a 120°C ($p \approx 98,1$ kPa) por 40 minutos.

Em seguida, foram adicionados aos tubos 50µL de ácido sulfúrico (3,5M) para acidificação do hidrolisado. Neste momento, as amostras diluídas em 100µL foram avolumadas, adicionadas a 900µL de água destilada. Uma alíquota de 50µL foi transferida para um novo microtubo.

Para realizar a curva padrão de hidroxiprolina (Sigma Aldrich, USA) foi utilizada uma solução com 1000µg/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 apresentassem concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL de hidroxiprolina. De cada microtubo diluído, também foram transferidos 50µL para novos microtubos.

Foram adicionados às amostras de alíquotas da curva padrão e ao branco, 450µL de Cloramina T (0,0025M), após 25 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionados 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 aliquotadas em microplaca de 96 poços em triplicata, para serem lidas à absorbância de 560nm em leitor de placa (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Os valores de absorbância obtidos foram calculados utilizando a equação da curva padrão.

5.5 ANÁLISE DE BIOCOMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS

5.5.1 Cultivo de células-tronco mesenquimais

Foram coletadas amostras de tecido adiposo humano de aproximadamente 0,5 cm² 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.

A 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), adicionando 1% (v/v) de antibiótico/antimicótico (Sigma Aldrich, EUA) e incubados por 37°C/5% CO₂.

Ao atingir uma confluência de aproximadamente 90%, as células foram submetidas ao processo de cultura secundária. A partir dos testes de diferenciação celular (condrogênica, adipogênica e osteogênica) sugeriu-se que as células fossem classificadas como células-tronco mesenquimais pelo grupo de pesquisa do NGHM-UFES. Esse material foi cedido ao NBT para o estudo de biocompatibilidade dos hidrogéis.

Para cultura de rotina, as CTM's foram incubadas a 37°C/5% CO₂ com meio basal *Stable Cell*[™] 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). A troca do meio de cultura foi realizada a cada 3 dias. As células foram visualizadas e fotografadas através do microscópio Axio Observer 3 (Zeiss).

5.5.2 Avaliação da atividade metabólica celular

As CTM's humanas foram colocadas em placas de 96 poços na densidade de 10^4 /poço e foi adicionado 100 μ L de hidrogel fetal enriquecido com PRP (10 e 20%). Como controle, foi utilizado o hidrogel fetal puro a fim de avaliar o efeito das diferentes concentrações do PRP no hidrogel e sua relação com a cultura celular, bem como CTM's sem hidrogel.

5.5.2.1 Efeito de diferentes concentrações de PRP

Após o plaqueamento do hidrogel, 10% e 20% de PRP ativado foram adicionados aos poços. Como controle, foi utilizado o hidrogel fetal puro. Os meios foram substituídos a cada 3 dias e após 6 dias de cultivo foi realizado o teste de MTT. No sexto dia, as células foram incubadas com 50 μ L de solução MTT (5mg mL⁻¹) a 450 μ L de DMEM-*High Glucose* durante 4 horas, a 37°C e a 5% CO₂.

Posteriormente, a solução de MTT foi descartada, foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico ácido e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi medida a 570nm em espectrofotômetro (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Os experimentos foram realizados em oituplicata.

5.5.2.2 Curva de proliferação celular

Para a curva de crescimento celular durante a incubação com o hidrogel enriquecido com PRP, as CTM's foram plaqueadas em 3 placas diferentes, uma para cada dia de leitura, pois nesse teste, o MTT seria realizado nos dias 3, 6 e 9 após a incubação.

A partir do plaqueamento do hidrogel, 10% e 20% de PRP ativado foram adicionados aos poços das 3 placas. Como controle, foi utilizado o hidrogel fetal puro. Os meios foram substituídos a cada 3 dias e no terceiro, sexto e nono dia após o início da cultura celular, foi realizado o teste de MTT: as células foram incubadas com 50 μ L de solução MTT (5mg mL⁻¹) a 450 μ L de DMEM-*High Glucose* durante 4 horas, a 37°C e a 5% CO₂.

Em cada dia de análise, a absorvância foi medida a 570nm em espectrofotômetro (Modelo Varioskan Flash, Thermo Fisher). Esse experimento foi realizado em oituplicata.

5.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

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

5.7 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 $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO E FORMAÇÃO DO HIDROGEL

6.1.1 Aspecto visual do osso descelularizado e produção do hidrogel

Após a descelularização, o osso fetal apresentou aspecto esbranquiçado, sugerindo a eficácia na remoção de células e gordura, que em seguida, passou pelo processo de moagem, desmineralização e execução do hidrogel enriquecido, como mostra a Figura 1.

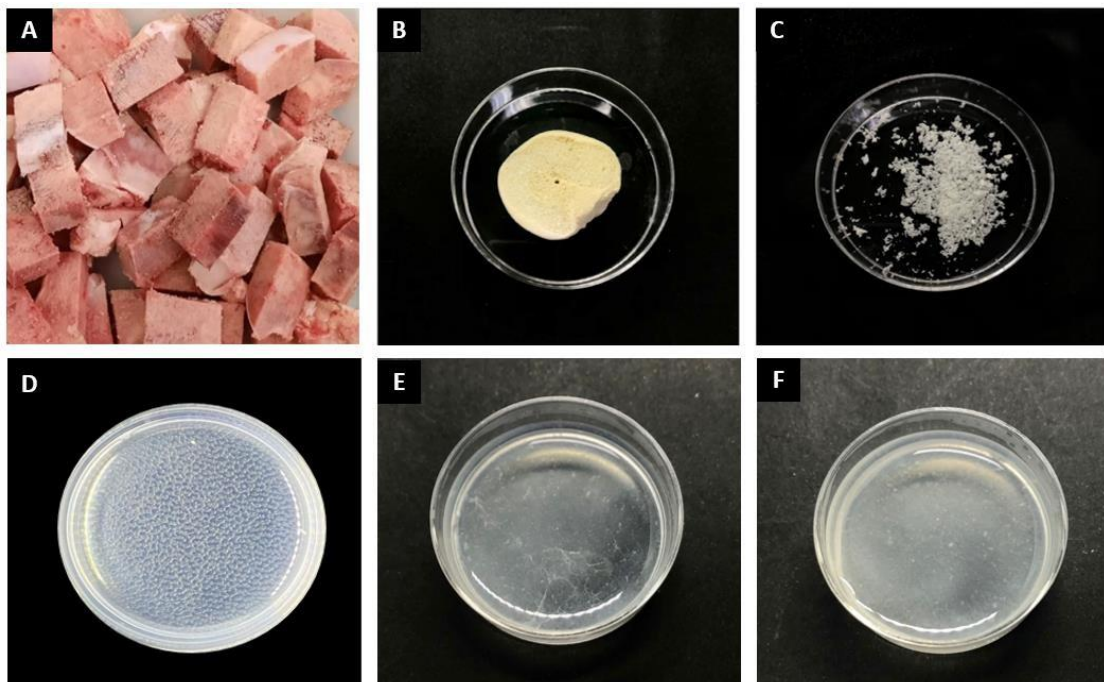


Figura 1: Blocos de osso fetal *in natura* (A), bloco de osso fetal descelularizado (B), osso fetal moído descelularizado e desmineralizado (C), hidrogel fetal (D), hidrogel fetal enriquecido com 10% de PRP (E) e hidrogel fetal enriquecido com 20% de PRP (F).

6.1.2 Quantificação de SDS residual

A curva padrão confeccionada com concentrações de SDS entre 0,01% e 0,5% ($R=0,989$) está exposta na Figura 2.

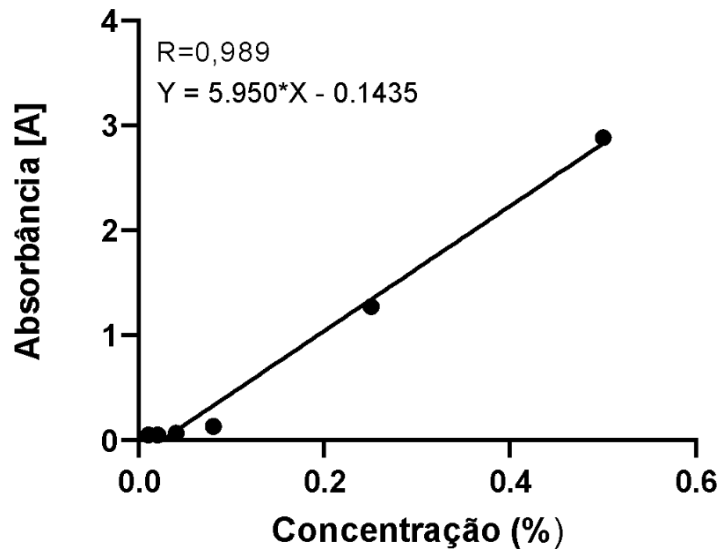


Figura 2: Curva padrão de SDS confeccionada com concentrações entre 0,25% e 0,01%. $R=0,989$.

O SDS remanescente das amostras de osso fetal em grânulo, da matriz digerida (pré-gel) e do hidrogel fetal estão exibidos na figura 3.

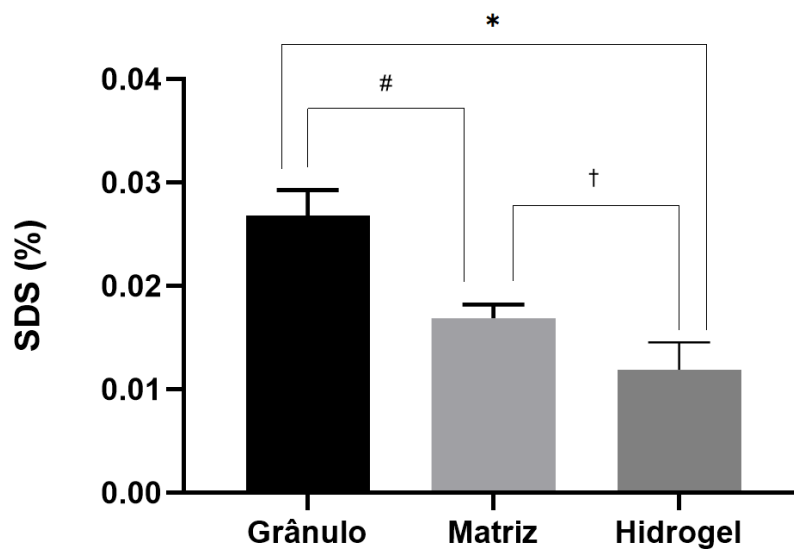


Figura 3: Detergente residual em amostras de osso fetal em Grânulo ($n=4$), Matriz Digerida ($n=4$) e Hidrogel Fetal ($n=4$). Os dados estão expressos como média \pm EPM; (* $p<0,05$ grânulo vs hidrogel; # $p<0,05$ grânulo vs matriz; † $p<0,05$ matriz vs hidrogel; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey).

A análise dos dados demonstrou que houve diferença estatística significativa para o valor percentual de SDS residual (SDS%) presente na amostra Grânulo ($0,026\% \pm 0,024$ n=4) e Matriz ($0,016\% \pm 0,001$ n=4) com $p = 0,0004$, bem como entre amostras Grânulo e Hidrogel ($0,011\% \pm 0,002$ n=4) com $p = <0,0001$. Houve ainda diferença significativa entre as amostras Matriz e Hidrogel ($p=0,0280$).

Em virtude das análises, pode-se afirmar que a quantidade de SDS final encontrada no hidrogel foi de aproximadamente 0,012%. Anteriormente às etapas de lavagem e de execução do hidrogel, a concentração de SDS no osso em grânulo e da matriz eram de 0,026% e 0,017% respectivamente. Estes resultados demonstram que as etapas de lavagem e de diluições para produzir o hidrogel promoveram uma redução de aproximadamente 50% da concentração de SDS residual presente nas amostras após a descelularização.

6.1.3 Quantificação de DNA

A figura 4 exibe uma comparação entre o osso fetal controle (não descelularizado), o osso fetal descelularizado e o hidrogel fetal, avaliando a eficiência do processo de remoção das células.

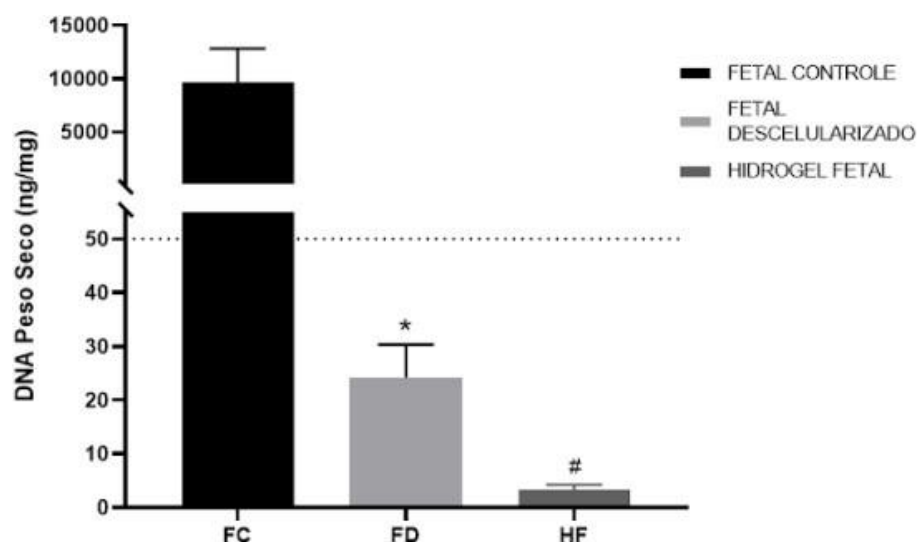


Figura 4: Concentração de DNA em ng/mg de tecido seco dos diferentes grupos. Fetal Controle (FC, n=8), Fetal Descelularizado (FD, n=8) e Hidrogel Fetal (HF, n=8). Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p<0,05$ fetal descelularizado vs fetal controle; # $p<0,05$ hidrogel fetal vs fetal descelularizado. 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.

Quando se compara os valores de DNA das amostras fetais controle (FC= 9650,95 ng/mg \pm 9011 n=8) e descelularizadas (FD= 24,23 ng/mg \pm 17,27 n=8), apura-se uma redução significativa ($p = 0,0091$), cerca de 99,75% de DNA para o osso fetal.

Seguindo o processo de preparo do hidrogel, quando o osso passa pela fase de desmineralização, a quantidade de DNA nas amostras reduziu ainda mais. O hidrogel de origem fetal (HF= 3,34 ng/mg \pm 1,75 n=8) apresentou cerca de sete vezes menos DNA do que o tecido ósseo descelularizado.

6.1.4 Análise de hidroxiprolina

A partir da quantidade de hidroxiprolina presente nas amostras, obteve-se a curva padrão com concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL ($R=0,9907$), como mostra a Figura 5.

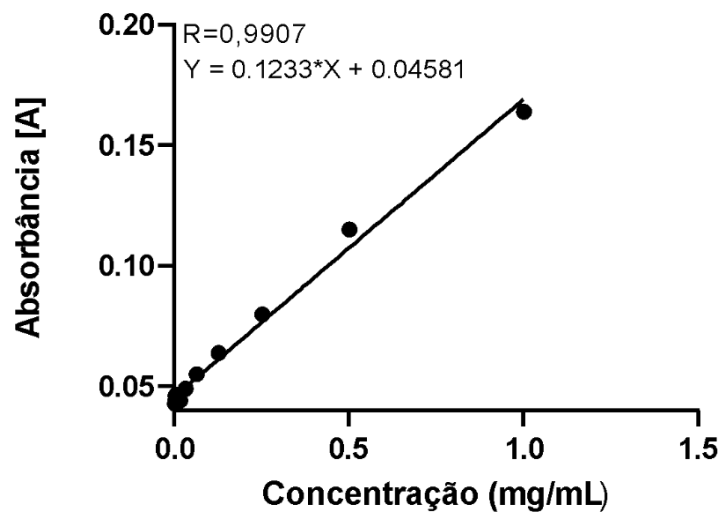


Figura 5: Curva padrão de hidroxiprolina confeccionada com concentrações entre 1 e 0,00048 mg/mL.

Os resultados da concentração de hidroxiprolina no osso fetal descelularizado e no osso fetal *in natura* (controle) estão expostos na Figura 6.

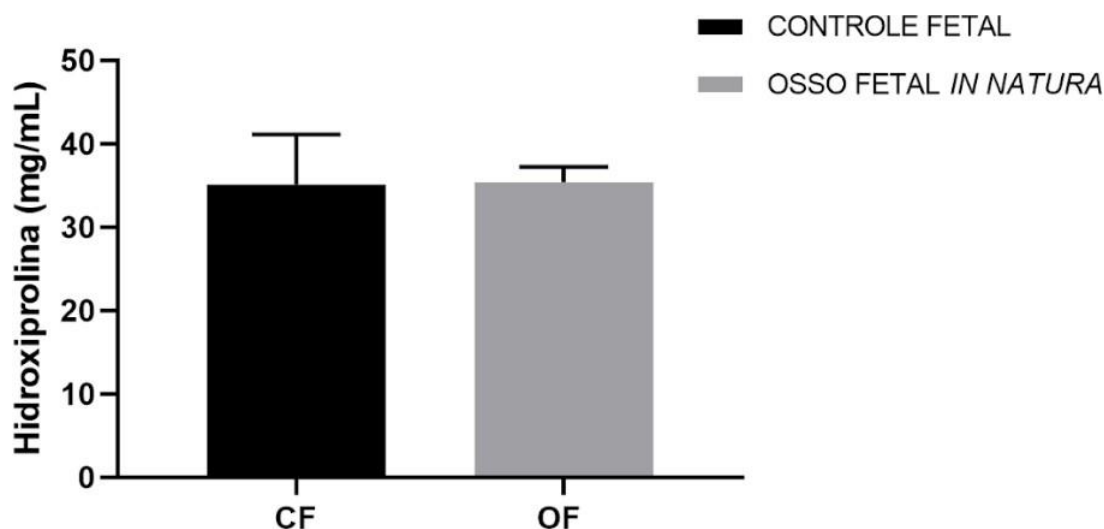


Figura 6: Concentração de hidroxiprolina por mL de tecido digerido. Osso fetal controle descelularizado (CF, n=4) e Osso Fetal *in natura* (OF, n=4). Os dados estão expressos em média \pm EPM. Teste *t* não pareado).

Não houve diferença significativa entre as amostras de Controle Fetal (CF 35,14 mg/mL \pm 6 n=4) e o Osso Fetal *in natura* (OF 35,43 mg/mL \pm 1,83 n=4). Conforme os resultados, afirma-se que o processo de descelularização manteve as concentrações de hidroxiprolina no osso fetal ($p= 0,9291$) validando a integridade do colágeno presente na matriz extracelular.

6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Foi observada a microarquitetura dos hidrogéis derivados de MEC óssea bovina fetal enriquecida com PRP, através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados estão exibidos na Figura 7. Pequenos grânulos foram encontrados (indicados pelas setas brancas) e serão discutidos posteriormente.

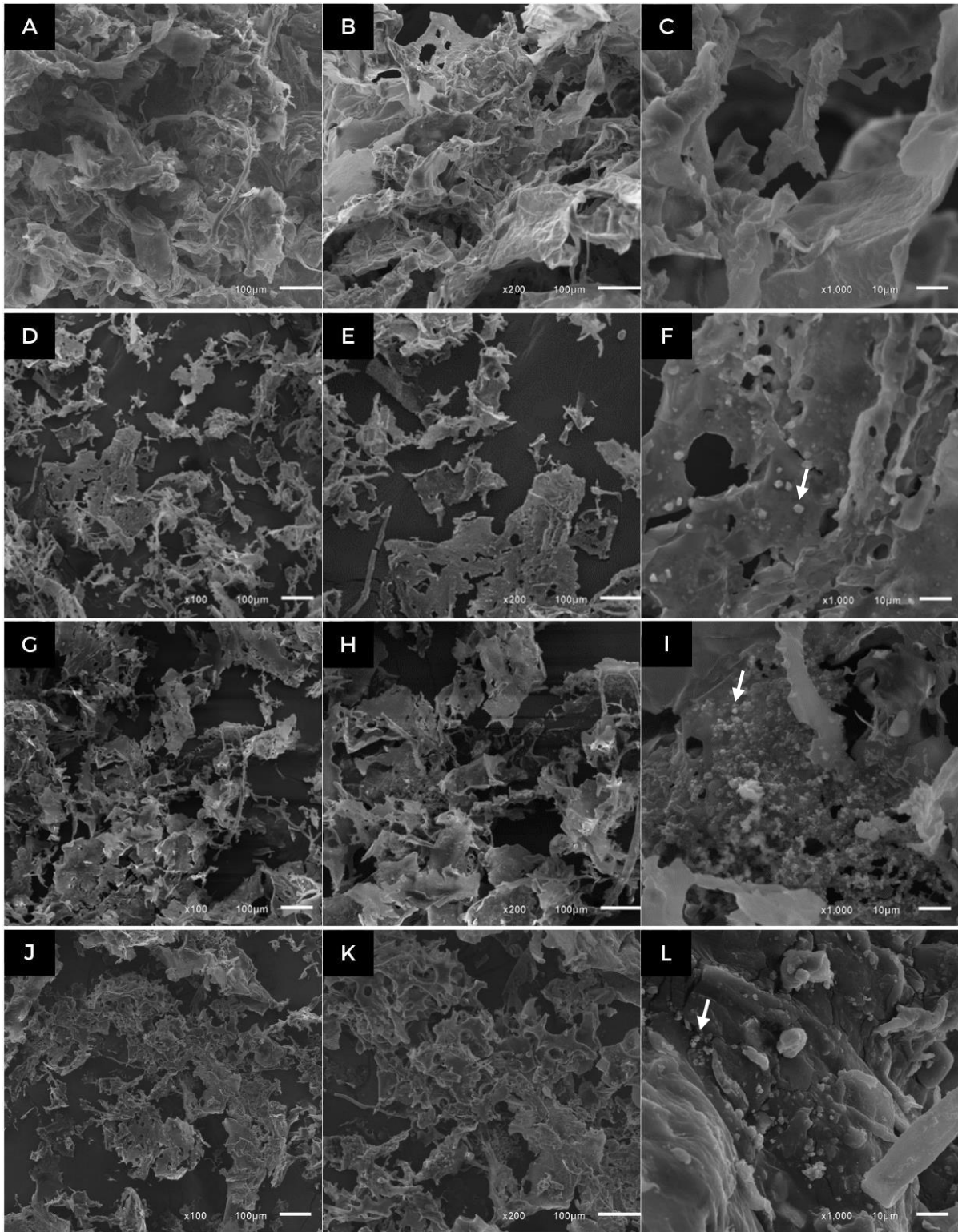


Figura 7: Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura da arquitetura dos hidrogel de MEC óssea fetal pura (A, B e C), hidrogel enriquecido com 10% de PRP (D, E e F), 20% de PRP (G, H e I) e o PRP liofilizado (J, K e L). Barra de escala: A, D, G e J: 100µm, B, E, H e K: 100µm e C, F, I e L: 10µm. Com 100x, 200x, 1.000x de magnificação, respectivamente. Setas brancas indicando a presença de grânulos.

6.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

6.3.1 Cultivo de células-tronco mesenquimais

Avaliando a biocompatibilidade dos hidrogéis, as CTM's apresentaram uma morfologia típica fibroblastóide, na qual as células são alongadas e fusiformes (Figura 8), conforme descrito por Motaln e Schichor (2010).

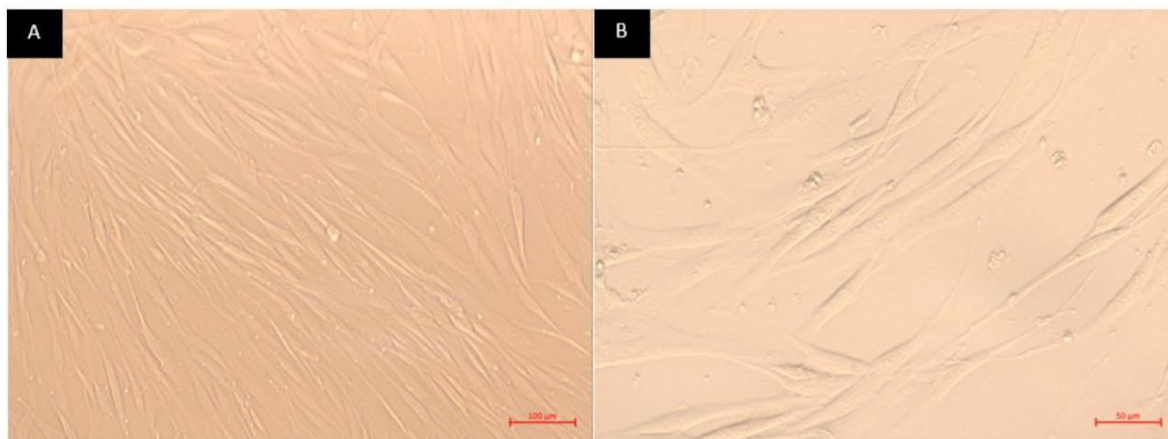


Figura 8: Células-tronco mesenquimais demonstrando sua morfologia fusiforme. Barra de escala: A: 100 µm, B: 50 µm. Aumento de 100x e 200x, respectivamente.

6.3.2 Proliferação celular

Na atividade metabólica celular, observou-se que a proliferação celular foi sensível ao PRP. Na análise comparativa, o crescimento foi dependente do percentual aplicado, ou seja, os valores de MTT aumentaram à medida que a porcentagem de PRP aumentou (Figura 9).

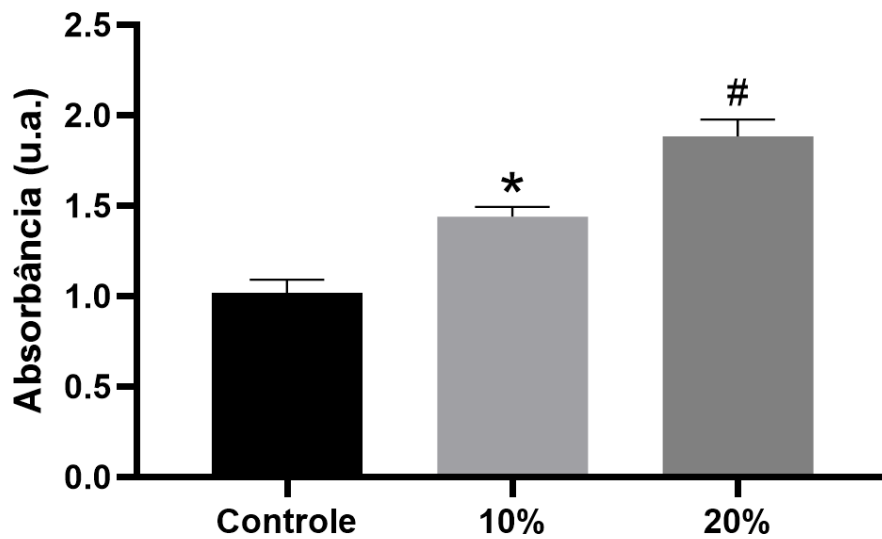


Figura 9: Avaliação da proliferação celular por MTT após 3 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$ controle vs 10%; # $p < 0,05$ 10% vs 20%; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.

Esse crescimento foi proporcional às doses, portanto, 20% de PRP induziu um maior índice de proliferação ($1,884 \pm 0,022$ $n=8$) comparado a 10% ($1,441 \pm 0,144$ $n=8$) ou ao hidrogel fetal puro ($1,017 \pm 0,216$ $n=8$).

Na avaliação em curva de crescimento, os resultados foram similares. Ao longo dos 9 dias de experimento, houve aumento progressivo da proliferação celular, como mostra a Figura 10.

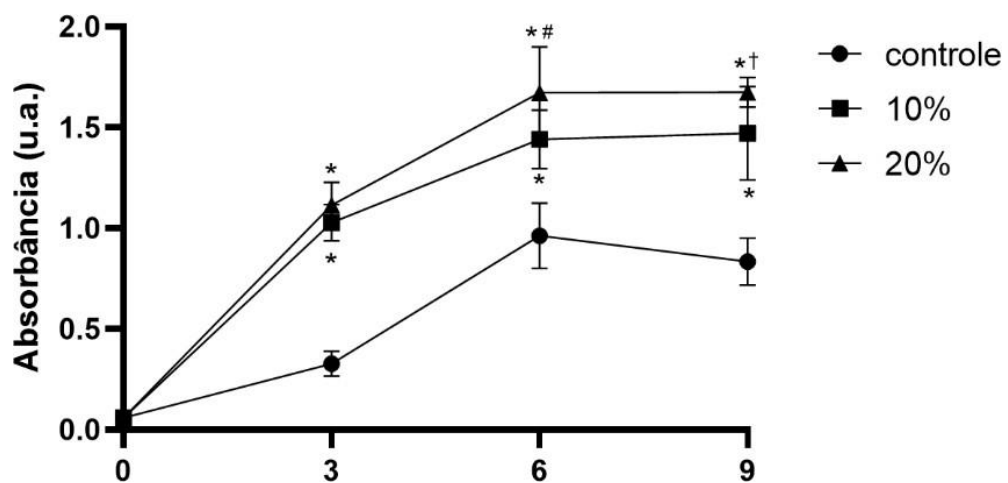


Figura 10: Avaliação de proliferação celular por MTT após 3, 6 e 9 dias de cultivo celular. Os dados estão expressos em média \pm EPM; * $p < 0,05$ controle vs 10% e 20%; # $p < 0,05$ 10% vs 20%; † $p < 0,05$ 10% vs 20%; 2-way ANOVA, pós teste de Tukey.

Comparando o percentual aplicado, foi evidenciado que 20% de PRP ($1,130 \pm 0,761$ n=8) estimula ainda mais esse crescimento quando comparado às amostras tratadas com 10% de PRP ($0,999 \pm 0,659$ n=8) ou àquelas que foram cultivadas com hidrogel fetal puro ($0,545 \pm 0,424$ n=8).

7 DISCUSSÃO

Embora existam avanços progressivos em pesquisas sobre bioengenharia tecidual, a busca por um tratamento convincente para a regeneração de tecido ósseo ainda é complexa (SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014). Recentemente, essa investigação constante por novas alternativas eficazes e seguras para a regeneração óssea, resultou em inovações que podem ser clinicamente impactantes. A utilização de arcabouços de matrizes teciduais descelularizadas, podem ser consideradas um marco para a próxima geração de biomateriais que estão sendo desenvolvidos (LI *et al.*, 2015).

De uma maneira geral, os protocolos de descelularização óssea encontrados na literatura, foram todos padronizados ou destinados a tecidos maduros adultos, que possuem composição de matriz extracelular diferente dos tecidos fetais ou neonatais (BENDERS *et al.*, 2013).

Diante disso, buscando desenvolver um biomaterial derivado de tecido ósseo fetal, a descelularização mostrou-se eficaz para a remoção de células e matéria orgânica. A avaliação da descelularização foi feita através da quantificação de DNA, SDS residual e hidroxiprolina.

O detergente utilizado na descelularização (SDS), atua solubilizando as membranas celulares e as membranas nucleicas, sendo eficaz para a remoção de células, entretanto, essa mesma substância pode desnaturar proteínas, remover glicosaminoglicanos, promover alterações na estrutura e bloquear o crescimento celular em tecidos descelularizados (HE *et al.*, 2017; FERNANDEZ-PÉREZ; AHEARNE 2019).

De acordo com Zvarova e colaboradores (2016), existe um limiar citotóxico de concentração de SDS residual diferente para cada tipo de célula. Nas CTM's humanas, o limiar encontrado foi de 0,002%, sendo que nesse estudo, o percentual encontrado no hidrogel foi de 0,012%, inferindo que o SDS residual das amostras pode ter influenciado no nível de proliferação celular.

De acordo com Crapo, Gilbert e Badylak (2011), a quantificação de DNA residual é considerada o padrão ouro para confirmação de uma descelularização eficiente.

Diante dos resultados, sugere-se que o protocolo de descelularização obteve sucesso, promovendo uma diminuição significativa na quantidade de DNA no tecido ósseo.

Os níveis de DNA residual foram decrescentes à medida que os processos iam ocorrendo, um fato que é considerado comum de acordo com o estudo de FU *et al.*, (2016), pois os processos para produção do hidrogel diminuem a quantidade de DNA e mantêm-se em uma faixa inferior que 50 ng/mg, sendo esse valor considerado padrão por Crapo, Gilbert e Badylak (2011).

O fato do tecido nativo fetal (FC) ter apresentado um alto nível de DNA em relação, está relacionado com o tipo de amostra coletada, pois comparando com o estudo de LEI *et al.* (2015), as amostras *in natura* exibem maior conteúdo orgânico, sangue e células, sendo assim, mais DNA.

Seguindo com a avaliação da descelularização, Sawkins e colaboradores (2013) consideraram que a hidroxiprolina forma 14,3% do colágeno total no tecido ósseo, sendo assim, o teor desse aminoácido é usado como parâmetro para estabelecer a quantidade de colágeno em tecidos.

Com base no estudo de Friedrich (2017), quanto maior a concentração de detergente utilizado na descelularização, maior é a chance de remover moléculas importantes da matriz, como o próprio colágeno, dessa forma, conclui-se que apesar do SDS residual estar alto o suficiente para influenciar na proliferação celular, não comprometeu a integridade do colágeno presente na matriz extracelular do osso fetal.

O colágeno é um componente essencial para uma boa reticulação do hidrogel. O estudo de LI *et al.* (2018) relata que o colágeno contribui para promover a proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais ósseas, induzindo a osteogênese. Sendo assim, os hidrogéis derivados de MEC são reticulados pela molécula de colágeno, formando uma rede tridimensional.

Quanto maior a quantidade desse polímero, maior será o grau de reticulação e mais rígido ficará o hidrogel (LI *et al.*, 2018), portanto, a rigidez do hidrogel influencia na quantidade e qualidade celular. Os resultados desse estudo sugerem que a quantidade de colágeno presente nas amostras são adequadas e não possuem uma

diminuição exacerbada ao passar pela descelularização, logo, o hidrogel não deveria ter sua reticulação prejudicada.

Ao enriquecer o hidrogel com PRP, a viscosidade aumentou progressivamente de acordo com o percentual aplicado. Isso pode ser justificado juntamente com o estudo realizado por Lucarelli *et al.* (2003), descrevendo que a amostra apresenta mais viscosidade a partir do momento em que a trombina é liberada através do ativador plaquetário.

Um resultado semelhante foi relatado no estudo de Ahmadipour *et al.* (2020), onde desenvolveram um hidrogel derivado do composto químico silsesquioxano e utilizaram o PRP como agente co-gelificante e intensificador de crescimento celular. Os hidrogéis foram caracterizados quanto à sua injetabilidade, tempo de gelificação, temperatura de transição de fase e viscosidade. Esse trabalho obteve hidrogéis viscosos, com maior força mecânica e potencializaram o crescimento celular.

O hidrogel enriquecido com PRP desenvolvido nesse estudo também obteve aumento na taxa de proliferação celular, concluindo que os fatores de crescimento, os efeitos após liberação da trombina e as demais características bioquímicas dessa substância, auxiliam e potencializam a atividade mitótica de CTM's.

O crescimento observado foi proporcional às doses, sendo que, 20% de PRP induziu um maior índice de proliferação comparado a 10% ou ainda, quando comparado ao hidrogel fetal puro (controle). Este resultado foi semelhante ao estudo promovido por Lucarelli *et al.* (2003), que evidenciou aumento nos valores de MTT proporcionais às porcentagens aplicadas na cultura, comparadas àquelas que não foram tratadas com PRP.

Essa proporção não deve ser aumentada progressivamente, pois de acordo com o trabalho desenvolvido por Nagata *et al.* (2011), amostras com mais de 30% de PRP podem se tornar citotóxicas, sendo assim, altas concentrações de PRP podem suprimir o crescimento celular.

Na avaliação em curva de crescimento, os resultados foram similares. Ao longo dos 9 dias de experimento, houve um aumento progressivo da proliferação celular.

Comparando novamente com o percentual aplicado, provou-se que a estimulação da proliferação das CTM's foi proporcional às doses aplicadas.

Entretanto, pode-se observar que a proliferação foi estabilizada entre os dias 6 e 9 nas amostras tratadas com 20% de PRP isso pode ter acontecido por conta da ativação plaquetária com Cloreto de Cálcio, pois Rodriguez e colaboradores (2014) relataram que essa substância ativa e coagula o PRP, que posteriormente liberará fatores de crescimento ao longo de 7 dias.

Sendo assim, pode-se inferir que houve uma diminuição na entrega de fatores de crescimento necessários para potencializar a proliferação celular, deixando claro que há uma necessidade de veículos de entrega eficazes e capazes de liberar os fatores derivados do PRP por um longo período para maximizar seu potencial.

Outro ponto a ser observado é que durante os dias 6 e 9, houve um decréscimo nos níveis de proliferação celular nas culturas tratadas com hidrogel puro, evidenciando que as células cultivadas com PRP obtiveram um crescimento constante ao longo dos dias, corroborando o estudo de Lucarelli *et al.* (2003) em que os fatores de crescimento contidos no PRP podem aumentar a taxa de proliferação celular, sendo vantajoso para aplicações clínicas.

Como discutido anteriormente, o SDS residual encontrado nas amostras estava elevado (0,012%) e poderia prejudicar o índice de proliferação celular. Apesar dos resultados do MTT serem satisfatórios em relação aos percentuais de PRP aplicados, é válido considerar que o nível de crescimento das CTM's poderia ser maior caso o teor de SDS residual encontrado fosse abaixo do padrão (0,002%) estabelecido por de Zvarova *et al.* (2016).

Uma outra limitação deste estudo é que não foi identificado qual fator ou fatores de crescimento são responsáveis pela proliferação celular induzida pelo PRP. Porém, devido ao elevado número de fatores contidos, a identificação da combinação exata que induz a proliferação, exigirá novos testes e novas estratégias de investigação.

As imagens obtidas pelo MEV permitem a visualização do arcabouço proteico dos hidrogéis, que são essenciais para formar uma rede tridimensional. Essas imagens são similares às encontradas no estudo de Amaral (2018), que realizou esse

experimento com hidrogel a partir de MEC de osso bovino para visualizar a ultraestrutura do hidrogel.

Pequenos grânulos foram observados nas imagens dos hidrogéis enriquecidos com PRP (indicados pelas setas), sugerindo ser as plaquetas que foram adicionadas ao biomaterial durante o processo.

Comparando as imagens do hidrogel enriquecido com 10 e 20% de PRP com o PRP puro, observa-se uma semelhança entre os grânulos. Figuras similares foram encontradas no estudo de Tomaiuolo *et al.* (2020), onde realizou análises através das imagens de plaquetas no MEV, levando a conclusão de que os grânulos encontrados poderiam de fato ser as plaquetas e que o enriquecimento do hidrogel ocorreu de forma adequada.

O hidrogel desenvolvido de MEC fetal enriquecida com PRP é inédito, apresenta um grande potencial para estudos na área da bioengenharia tecidual auxiliando na busca por biomateriais que promovam a regeneração óssea.

Esse biomaterial já demonstrou aumentar a porcentagem do volume ósseo e mineralização em modelos *in vivo* (GOTHARD *et al.*, 2015), portanto, realizar testes de diferenciação osteogênica com esse hidrogel, é uma alternativa interessante a fim de analisar se os fatores de crescimento contidos no PRP potencializam a diferenciação das CTM's, assim como potencializam sua proliferação.

Dessa forma, o conjunto dessas análises poderá contribuir de maneira significativa na descoberta de biomateriais aplicáveis na bioengenharia de tecidos para o reparo ósseo.

É válido ressaltar que nos últimos anos, uma série de artigos vem relatando hidrogéis e suas vantagens para aplicações clínicas, entretanto, muitos aspectos não são completamente esclarecidos. Embora não seja esperada uma compreensão completa de uma área recente e complexa, muitas questões importantes foram comprovadas, e os efeitos da interação entre hidrogel e PRP foram analisados.

8 CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado, foi possível obter conclusões importantes acerca do comportamento da MEC óssea através das etapas de descelularização, avaliação da eficiência, produção do hidrogel, cultura *in vitro*, sobre as interferências e limitações às quais o estudo se submete bem como a investigação dos efeitos descritos.

O mecanismo proposto foi capaz de aumentar os níveis de proliferação celular, portanto, cabe ressaltar que os resultados apresentaram boa correlação com os princípios teóricos encontrados na bibliografia. Mesmo em fase inicial, o biomaterial desenvolvido apresentou potencialidade de aplicação.

Observou-se que a descelularização ocorreu de maneira eficaz, removendo as células e matéria orgânica do osso nativo. Os testes que seguiram para avaliar essa eficiência mostraram que o DNA foi reduzido e o colágeno da matriz manteve-se presente. Todavia, o SDS residual não exibiu níveis adequados de acordo com a literatura, exigindo que novas lavagens sejam realizadas a fim de reduzir esse percentual e tornar o biomaterial mais seguro para o cultivo celular.

Outra observação incide sobre a produção do hidrogel e o enriquecimento com PRP, o qual tem influência sobre a potencialização da proliferação celular. Essa interação, foi importante para comprovar que através da ativação plaquetária, foi possível aumentar a viscosidade do hidrogel, tornando-o mais adequado para futuras aplicações clínicas.

A biocompatibilidade desse hidrogel mostrou-se satisfatória, visto que o teste de MTT apresentou crescimentos celulares progressivos de acordo com o percentual aplicado de PRP, evidenciando que essa substância é promissora para auxiliar na busca por biomateriais compatíveis e que promovam o repovoamento de células no *scaffold*.

Considerando a inovação do hidrogel enriquecido com PRP e os efeitos relacionados, alguns aspectos precisam ser aperfeiçoados. Como avaliar as propriedades mecânicas do hidrogel a fim de aprimorar sua viscosidade ainda mais, avaliar a diferenciação osteogênica das células cultivadas com o hidrogel enriquecido com PRP e por fim, identificar e quantificar os fatores de crescimento presentes no PRP aplicado ao hidrogel, pois apesar do presente estudo ter um objetivo aplicado, ainda necessita

de melhorias para futuramente colaborar com aplicações clínicas na bioengenharia de tecidos ósseos.

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.

ABDULGHANI, Saba; MITCHELL, Geoffrey R. Biomaterials for in situ tissue regeneration: A review. **Biomolecules**, v. 9, n. 11, p. 750, 2019.

ALOM, Noura et al. Bone extracellular matrix hydrogel enhances osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts and mouse primary calvarial cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 106, n. 2, p. 900-908, 2018.

AHMADIPOUR, Saeedeh et al. Polyhedral oligomeric silsesquioxane/platelets rich plasma/gelrite-based hydrogel scaffold for bone tissue engineering. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 26, p. 3147-3160, 2020.

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

ARKENBERG, Matthew R.; NGUYEN, Han D.; LIN, Chien-Chi. Recent advances in bio-orthogonal and dynamic crosslinking of biomimetic hydrogels. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 35, p. 7835-7855, 2020.

BENDERS, K. E. M. M. et al. Extracellular matrix scaffolds for cartilage and bone regeneration. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 169-176, 2013.

BHATTACHARJEE, Promita et al. Silk scaffolds in bone tissue engineering: An overview. **Acta biomaterialia**, v. 63, p. 1-17, 2017.

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.

CHAUDHARI, Atul A. et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 12, p. 1974, 2016.

DEBNATH, Tanya et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells grown on chitosan hydrogel. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120803, 2015.

DING, Zhaozhao et al. Silk biomaterials for bone tissue engineering. **Macromolecular Bioscience**, v. 21, n. 8, p. 2100153, 2021.

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

EVERTS, Peter et al. Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7794, 2020.

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.

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.

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

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.

HOKUGO, Akishige et al. Augmented bone regeneration activity of platelet-rich plasma by biodegradable gelatin hydrogel. **Tissue engineering**, v. 11, n. 7-8, p. 1224-1233, 2005.

HUANG, Qitong et al. Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 20, p. 6255-6275, 2017.

KIM, Hwan D. et al. Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 23, p. 1700612, 2017.

KOBAYASHI, Eizaburo et al. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. **Clinical oral investigations**, v. 20, p. 2353-2360, 2016.

LANG, Siegmund; LOIBL, Markus; HERRMANN, Marietta. Platelet-rich plasma in tissue engineering: hype and hope. **European Surgical Research**, v. 59, n. 3-4, p. 265-275, 2018.

LI, Youbin et al. Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering. **Materials & Design**, v. 210, p. 110049, 2021.

LUCARELLI, Enrico et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. **Biomaterials**, v. 24, n. 18, p. 3095-3100, 2003.

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.

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.

NAGATA, Maria José Hitomi et al. A proporção de plasma rico em plaquetas/enxerto ósseo autógeno pode influenciar o reparo ósseo de defeito de tamanho crítico: estudo

radiográfico em calvária de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, p. 325-331, 2011.

PARK, Yujin; HUH, Kang Moo; KANG, Sun-Woong. Applications of biomaterials in 3D cell culture and contributions of 3D cell culture to drug development and basic biomedical research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2491, 2021.

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.

RODRIGUEZ, Isaac A. et al. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SALDIN, Lindsey T. et al. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. **Acta biomaterialia**, v. 49, p. 1-15, 2017.

SAMADI, Pouria; SHEYKHHASAN, Mohsen; KHOSHINANI, Hamed Manoochehri. The use of platelet-rich plasma in aesthetic and regenerative medicine: a comprehensive review. **Aesthetic plastic surgery**, v. 43, p. 803-814, 2019.

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

SOUZA, Maria V. de et al. Quantificação de fatores de crescimento na pele de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 599-612, 2014.

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.

TOMAIUOLO, Maurizio et al. Use of electron microscopy to study platelets and thrombi. *Platelets*, v. 31, n. 5, p. 580-588, 2020.

WEIBRICH, Gernot et al. Correlation of platelet concentration in platelet-rich plasma to the extraction method, age, sex, and platelet count of the donor. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 16, n. 5, 2001.

XU, H. et al. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2014.

ZVAROVA, B. 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. 418-28, 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA

O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo