



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA POLITÉCNICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE

**DESENVOLVIMENTO DE NOVO BIOCOMPÓSITO HIDROGEL E
AVALIAÇÃO DA SUA APLICABILIDADE NA MEDICINA REGENERATIVA
E BIOIMPRESSÃO**

LETÍCIA MOURA MATUCHESKI

CURITIBA

2020

LETÍCIA MOURA MATUCHESKI

**DESENVOLVIMENTO DE NOVO BIOCAMPÓSITO HIDROGEL E
AVALIAÇÃO DA SUA APLICABILIDADE NA MEDICINA REGENERATIVA
E BIOIMPRESSÃO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
DO PARANÁ, COMO REQUISITO PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE SOB
ORIENTAÇÃO DA PROFA. DRA. BEATRIZ
LUCI FERNANDES.

CURITIBA

2020

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Pamela Travassos de Freitas – CRB 9/1960

M445d 2020	<p>Matucheski, Leticia Moura</p> <p>Desenvolvimento de novo biocompósito hidrogel e avaliação da sua aplicabilidade na medicina regenerativa e bioimpressão / Leticia Moura Matucheski ; orientadora: Beatriz Luci Fernandes. – 2020. 68 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2020 Bibliografia: f. 64-68</p> <p>1. Engenharia biomédica. 2. Bioimpressão. 3. Células-tronco. 4. Imunologia de transplantes. 5. Medicina regenerativa. I. Fernandes, Beatriz Luci. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. III. Título.</p> <p>CDD 20. ed. – 610.28</p>
---------------	---



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Politécnica
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde

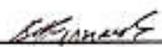
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 278

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA EM SAÚDE

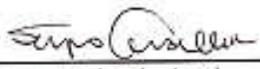
Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2020 às 08:00h na sala 01 do mestrado, 2º Andar-Bloco Verde, realizou-se a sessão pública de Defesa da Dissertação: **DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO BIOCAMPÓSITO HIDROGEL E AVALIAÇÃO DA SUA APLICABILIDADE NA MEDICINA REGENERATIVA E NA BIOIMPRESSÃO** apresentado pela aluna Leticia Moura Matucheski sob orientação da Prof. Dr. Beatriz Luci Fernandes como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Tecnologia em Saúde**, perante uma Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Beatriz Luci Fernandes
PUCPR (Presidente)



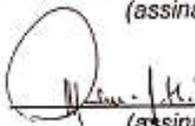
(assinatura) APROVADO
(Aprov/Reprov.)

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii
PUCPR (Examinador)



(assinatura) Aprovada
(Aprov/Reprov.)

Prof. Dr. João Palma Setti
UTFPR (Examinador)



(assinatura) APROVADO
(Aprov/Reprov.)

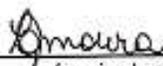
Início: 8:00h Término: 10:00h

Conforme as normas regimentais do PPGTS e da PUCPR, o trabalho apresentado foi considerado APROVADO (aprovado/reprovado), segundo avaliação da maioria dos membros desta Banca Examinadora.

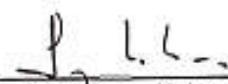
Observações: _____

O(a) aluno(a) está ciente que a homologação deste resultado está condicionada: (I) ao cumprimento integral das solicitações da Banca Examinadora, que determina um prazo de 30 dias para o cumprimento dos requisitos; (II) entrega da dissertação em conformidade com as normas especificadas no Regulamento do PPGTS/PUCPR; (III) entrega da documentação necessária para elaboração do Diploma.

ALUNO(A): Leticia Moura Matucheski



(assinatura)



Prof. Dr. Percy Nohama,
Coordenador do PPGTS PUCPR



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da minha vida e por fomentar em mim a paixão por descobrir.

À minha orientadora Dra. Beatriz Luci Fernandes, por acreditar em mim, me incentivar e aconselhar. Por ser meu exemplo de pesquisadora, professora e mulher.

À minha família, em especial aos meus pais por serem minha maior inspiração na busca pelos meus sonhos e meus maiores incentivadores desde meus primeiros passos tanto na vida, quanto na ciência.

Ao meu irmão, Thiago por todos os ensinamentos e apoio diário.

De maneira muito especial ao meu esposo, por aceitar, apoiar e incentivar minha dedicação a esse trabalho.

Aos meus amigos, de maneira especial às novas amizades que essa jornada me proporcionou.

À PUCPR por toda estrutura física e científica.

A CAPES pelo incentivo financeiro, sem ele, não seria possível essa realização.

E à todos, que de alguma forma me ajudaram a tornar possível a realização desse sonho.

RESUMO

Introdução: A engenharia de tecidos visa produzir estruturas capazes de substituírem tecidos ou órgãos e surge como esperança para a medicina regenerativa e para a prática dos transplantes por seu potencial de desenvolvimento de tecnologias promissoras e com grande perspectiva de aplicação como a fabricação de órgãos biomimetizados e funcionais, produzidos por impressão tridimensional precisa de células carregadas por biotintas. Essa estratégia, visa solucionar as principais barreiras impostas aos transplantes, como a escassez de doações efetivas por falta de compatibilidade genética que resulta atualmente em elevação da mortalidade por consequência da espera por um órgão em todo o mundo. Para que essa prática seja viável, se faz necessária a produção de novos substratos com propriedades específicas e compatíveis tanto à tecnologia de bioimpressão, quanto à utilização clínica. **Objetivo:** Nesse sentido, o presente trabalho tem por intuito, o desenvolvimento de um biocompósito biocompatível formado pela união de goma gelana e vitrocerâmico (osteoadutor) em fase de hidrogel. **Metodologia:** Para tanto se faz necessária a avaliação da biocompatibilidade por meio da viabilidade de células estromais em contato com o hidrogel durante cultivo e avaliação da permanência do potencial osteoadutor em diferentes proporções do vitrocerâmico no hidrogel (1% e 2%). **Resultados:** A viabilidade celular foi demonstrada durante os 14 dias de cultivo em todas as amostras enquanto o potencial indutor, observado apenas nas amostras de maior concentração do Vitrocerâmico. Dessa forma, a aplicabilidade sugerida para os biocompósitos testados são distintas, sendo a proporção de 1% passível de aplicação na medicina regenerativa e como biotinta inespecífica, já a proporção de 2%, se destina exclusivamente às especialidades odontológicas e ortopédicas. **Conclusão:** A aplicabilidade do novo biocompósito pode ser considerada, no entanto, estudos futuros são necessários para avaliação mais aprofundada quanto a interação com o organismo e certificação da segurança de aplicação do hidrogel de Vitrocerâmico.

Palavras chave: Biocompósitos; Biotintas; Bioimpressão de órgãos.

ABSTRACT

Introduction: Tissue engineering aims to produce materials capable of replacing tissues or organs and increase hope for regenerative medicine and for transplantation practice due to development of promising technologies and great application perspective such as the production of biomimetic and functional organs, displayed for accurate three-dimensional printing of cells carried by biotints. This strategy aims to solve barriers imposed on transplants, such as the lack of genetic compatibility that currently results in increased mortality due to waiting for an organ worldwide. For this, it is necessary to produce new substrates with specific characteristics applied to both bioprinting technology and clinical use. **Objective:** In this sense, the present work aims the development of a biocompatible biocomposite formed by the union of gelatin gum and vitroc ceramic (osteoinductor) in hydrogel phase. **Methodology:** It is necessary to evaluate the biocompatibility through the viability of cells, in contact with hydrogel during cultivation by AlamarBlue test and to evaluate the permanence of the osteoinductive potential in different proportions of the glass ceramic in the hydrogel (1% and 2%) by Osteoimage and DAPI. **Results:** Cell viability was demonstrated during the 14 days of culture in all samples, while the potential inducer, observed only in the samples with the highest concentration of the Vitroc ceramic. Thus, is suggested the distinct application of biocomposites. the proportion of 1% is amenable to application in regenerative medicine and as inespecific bioink, and 2% applicable to odontologic and orthopedic activities. **Conclusion:** The application of a new biocomposite can be considered, however, future studies are necessary for a further evaluation regarding the interaction with the organism and certification of the safety of application of the Vitroc ceramic hydrogel.

Keywords: Biocomposites; Bioinks; Organ bioprinting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fragmento de pastilha cristalizada de vitrocerâmico.....	38
Figura 2. Vitrocerâmico de anortita em pó.....	38
Figura 3. Esquema representativo da fabricação dos <i>scaffolds</i>	41
Figura 4. Geleificação de hidrogéis em proporções de 5,5% de GG.....	46
Figura 5. Hidrogel de vitrocerâmico em proporção de 1% (5a) e 2% (5b) incorporados à goma gelana a 5%.....	47
Figura 6. Tesde de solidificação do hidrogel em solução de cálcio.....	49
Figura 7. Gráfico da redução de reazurina – viabilidade celular.....	56
Figura 8. Teste de coloração DAPI.....	58
Figura 9. Ensaio de mineralização Osteoimage TM	60
Figura 10. Reconstrução óssea de estrutura trabecular em uma amostra de osso temporal	62
Figura 13. Transparência em gota solidificada de hidrogel em proporção de Biovit 1%.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D - tridimensionais

CAD – Desenho Assistido por Computador

CMM - Células Estromais Mesenquimais Multipotentes

CS - sulfato de condroitina

CT - célula-tronco

DMEM – Dulbecco Modified Eagle Medium

DMSO - dimetilsulfóxido

FBS - soro fetal bovino

GG - goma gelana

GlcN - glucosamina

HA - hidroxiapatita

M – Molar

MEC - Matriz Extracelular Circundante

MNC - Células Mononucleares

PBS - Solução Salina Fosfatada (do inglês *Phosphate-buffered saline*)

pH – Potencial Hidrogeniônico

PVA - poli (álcool vinílico)

UV - ultravioleta

μRBs - gelatina microribbons

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À ORIGEM	16
2.3 PROBLEMÁTICAS DO CENÁRIO ATUAL DOS TRANSPLANTES	17
2.4 ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS	20
2.5 BIOMIMÉTICA	22
2.6 BIOMATERIAIS – NATUREZA E PROPRIEDADES	22
2.7 BIOPOLÍMEROS	23
2.8 VITROCERÂMICOS	26
2.9 CÉLULAS-TRONCO	28
2.10 BIOTINTAS	29
2.12 PRINCIPAIS APLICAÇÕES da bioimpressão	31
2.13 AVANÇOS E LIMITAÇÕES NA BIOIMPRESSÃO DE ÓRGÃOS	34
3. Materiais e métodos	36
3.1 materiais	36
3.2 FABRICAÇÃO DO BIOCAMPÓSITO	37
3.3 TESTE DE SOLIDIFICAÇÃO	38
3.4 CULTIVO CELULAR	39
3.5 PRODUÇÃO DOS arcabouços	40
3.6 CULTIVO NOS SCAFFOLDS	41
3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	41
3.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS E MATRIZ MINERALIZADORA	42
3.9 DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NOS arcabouços	42
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
3.11 ANÁLISE DE APLICAÇÃO IN SITU DO HIDROGEL	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 FABRICAÇÃO DOS BIOCAMPÓSITOS	45
4.2 TESTE DE SOLIDIFICAÇÃO	47
4.3 CULTIVO CELULAR NOS arcabouços	49
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADERÊNCIA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	50
4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS E MATRIZ MINERALIZADORA	56
4.5 DISTRIBUIÇÃO CELULAR NOS arcabouços	60
4.6 APLICAÇÃO POR MEIO INJETÁVEL	60
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4.8 PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO	62
5. CONCLUSÕES	64
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	65
7. ANEXOS	66
9. REFERÊNCIAS	67

1. INTRODUÇÃO

A busca pelo aumento da qualidade e expectativa de vida estimula um desenvolvimento contínuo de inovações no campo da saúde. Impulsionada por esse desafio, a engenharia de tecidos emerge com o potencial de auxiliar a medicina de maneira eficaz na busca de novos tratamentos. Atualmente, os traumas, doenças e idade avançada da população são as causas mais frequentes de danos e falhas nos tecidos e órgãos e, apesar da capacidade intrínseca do corpo de reparar pequenas lesões, muitas vezes a única alternativa viável de tratamento é a substituição do órgão ou porções teciduais (O'BRIEN, 2011 ; TRAPPMANN, et al., 2012). A descoberta da possibilidade de substituição de tecidos e órgãos foi um marco importante para a medicina. No entanto, essa prática encontra barreiras e desafios como o baixo índice de doadores somado à restrição da compatibilidade genética que resultam na diminuição de doações efetivas, e uma problemática à nível mundial pelo constante aumento nas filas de espera. No Brasil o número de pacientes que aguardam por um órgão ultrapassa os 40 mil (ABTO, 2019) e, nos Estados Unidos, o número é superior a 100 mil entre pacientes adultos e pediátricos (ODT, 2019).

A engenharia de tecidos surgiu como esperança para esse cenário por ser uma tecnologia aplicável, principalmente, à medicina regenerativa e por ter sido proposta como novo método de resolução de problemas desde aos relacionados à regeneração tecidual, até à produção de órgãos personalizados. No entanto, para atender à demanda dessa tecnologia emergente aplicada à saúde, se faz necessário que sejam desenvolvidos, com um urgência, materiais capazes de serem aplicados de maneira segura proporcionando características terapêuticas e propriedades adequadas às aplicações pretendidas. Isso requer constante aprimoramento de técnicas e matérias-primas a serem destinadas à prática clínica.

Os avanços científicos necessários para aprimorar o campo da engenharia de tecidos têm sido direcionados à fabricação de tecidos complexos e órgãos por meio de biomateriais que são responsáveis pela ampla variedade de produtos biofabricados (MELCHELS et al.,2012). Ao contrário dos materiais

inertes, os biomateriais bioativos possuem a capacidade de biodegradabilidade e algum nível de interação com os tecidos circundantes além de apresentarem aplicabilidade como biotinta para bioimpressão por formarem filamentos extrusáveis pela bioimpressora que funciona pela tecnologia de impressão 3D, uma tecnologia promissora que pode ser usada para fabricar estruturas externas ou internas personalizadas em várias escalas. O sistema possui por ferramentas de manufatura comandadas por computador e fornece uma estratégia de construção de implantes que simulam o projeto arquitetônico dos tecidos vivos, possibilitando a biofabricação de tecidos complexos com precisão por meio de interação entre hidrogéis com diferentes propriedades e linhagens celulares (WANG, et al. 2019).

Uma classe de biomateriais com potencial significativo na contribuição para o desenvolvimento de tecidos são os hidrogéis de polímeros naturais por demonstrarem capacidade reparadora de tecidos moles, componente dominante na estrutura dos órgãos. A vantagem da sua aplicação em relação aos outros biomateriais, é a sua excelente biocompatibilidade, grande semelhança com a matriz extracelular, biodegradabilidade e baixa rejeição imunológica (NYAME et al., 2015). De maneira especial, os hidrogéis são ideais como biotintas para a bioimpressão, pela facilidade de extrusão proporcionada por sua estrutura maleável, mesmo em temperaturas amenas. Essa característica confere aos hidrogéis a possibilidade da sua extrusão com células do tecido desejado, conservando a viabilidade celular, de maneira a mimetizar com precisão o material biológico nativo.

Além disso, as estruturas em conformação 3D permitem cultivo celular mais eficaz por favorecer trocas gasosas e nutricionais proporcionando, conseqüentemente, maior proliferação e viabilidade celular (FORGET et al., 2017). O potencial de biodegradabilidade dos materiais polissacarídeos naturais que formam os hidrogéis, e a possibilidade de serem extrudados em conjunto com células viáveis, são características responsáveis pela construção de biofabricados que apresentam estrutura extremamente precisa e com biodegradabilidade controlável. Desta forma, é possível a construção de arcabouços biomaterial-células com degradação progressiva da estrutura (hidrogel), à medida que as células tomam o espaço do material degradado, resultando um tecido formado apenas por células (WILLIAMS, 2008). Por essas

características, os hidrogéis têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de pele *in vitro*, tecido cardíaco, adiposo, cartilaginoso e ósseo e na construção de tecidos híbridos com redes vascularizadas (NOH et al., 2019). No entanto, os hidrogéis possuem fragilidade mecânica, característica que limita sua aplicação de maneira individualizada.

Cada classe de biomaterial, apresenta características peculiares que favorecem ou limitam sua utilização em áreas específicas. Como descrito, o hidrogel apresenta maleabilidade e viscoelasticidade, característica contrária a apresentada pelos vitrocerâmicos que se apresentam com maior rigidez. Uma estratégia que vem sendo empregada à engenharia de novos materiais aplicados à medicina, é a formulação de biocompósitos resultantes da união de tipos de biomateriais distintos no intuito de formar um material com características específicas e aprimoradas. Nesse sentido, os hidrogéis funcionam como matriz do biocompósito, em conjunto com outros materiais dispersos em proporções distintas a fim de proporcionar ampla aplicabilidade (STEVENS; GILMORE; WALLACE, 2016).

O presente trabalho possui, como objetivo principal, o desenvolvimento de um biocompósito de caráter inovador L2F à base de goma gelana, um polissacarídeo emergente pela versatilidade de aplicação, aliado ao um biovitrocerâmico com propriedades específicas, sendo a principal delas, o potencial osteoindutor (SOUSA et al., 2012). Essa união forma um biocompósito apropriado para fabricação de uma variedade de materiais aplicáveis à medicina regenerativa pela união de características favoráveis (STEVENS; GILMORE; WALLACE, 2016). Para tanto, o biocompósito deve apresentar características biológicas importantes como biocompatibilidade e demonstrar características físicas que permitam a sua aplicação pelas técnicas empregadas na engenharia de tecidos como extrusão por impressora 3D e facilidade de injeção por seringa. Dessa forma, é possível avaliar se o novo material apresenta ou não, viabilidade de aplicação para que se prossiga com ensaios mais específicos necessários para maior entendimento da interações com linhagens celulares e com organismos vivos em estudos futuros.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a aplicabilidade na medicina regenerativa e bioimpressão do hidrogel biocompósito L2F.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo proposto, serão necessários alcançar os seguintes objetivos específicos:

1. Obter biocompósitos com proporções dos materiais definidas;
2. Analisar a tendência à solidificação de cada proporção;
3. Avaliar a viabilidade celular *in vitro* das células em contato com os biocompósitos;
4. Avaliar o potencial osteoindutor dos biocompósitos;
5. Simular a aplicação injetável do biocompósito em osso temporal humano.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DOS TRANSPLANTES

A descoberta da possibilidade de substituição de tecidos e órgãos foi um marco alcançado pela medicina. O transplante representa um avanço histórico na busca pelo aumento da expectativa e qualidade de vida da humanidade e, desde os primeiros relatos está associado à esperança da continuidade do percurso da vida.

Com o propósito de restabelecer a função do órgão ou tecido disfuncional, a prática dos transplantes teve sua primeira tentativa cientificamente documentada em 1668, realizada pelo cirurgião holandês Job van Meekeren com o intuito de reparar o crânio fraturado de um soldado com a utilização de um fragmento ósseo canino (xenotransplante). O transplante obteve sucesso comprovado quando, por ser ameaçado de excomunhão da sua igreja (dado impacto gerado à sociedade da época), o soldado solicitou a retirada do tecido canino, e o procedimento foi impossibilitado devido à osteointegração obtida (WEIGEL, 1993).

Uma lacuna de mais de três séculos separara a prática de Meekeren da cirurgia que é considerada, pela literatura, o início da história dos transplantes de órgãos, realizada em 1954. O transplante foi realizado entre irmãos gêmeos, quando Richard recebeu um rim de seu irmão gêmeo univitelino Herrick pelo cirurgião norte americano Joseph Edward Murray. O transplante foi bem sucedido e Richard faleceu oito anos após o procedimento. Murray foi responsável também pelo primeiro transplante renal bem-sucedido realizado a partir de doador falecido em 1962 (MACHADO, 2005)

Em 1963, Thomas Starzl conseguiu o primeiro transplante de fígado humano e James Hardy realizou o primeiro transplante de pulmão. A década de 60 foi marcada por várias tentativas de transplantes de medula óssea (MO) que apresentaram complicações, levando à descoberta da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), e elucidações importantes quanto à existência e funções dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (THOMAS, 2000). Na mesma década, o primeiro transplante alogênico de coração foi realizado na África do Sul. Louis Washkansky de 54 anos portador de uma doença nas artérias

coronárias e múltiplos infartos do miocárdio sobreviveu por 18 dias e faleceu em decorrência de uma pneumonia (PEREIRA, 2004).

Na década de 70, o avanço nas pesquisas e desenvolvimentos de medicamentos imunossupressores mudou o cenário dos transplantes possibilitando melhores resultados de compatibilidade, no entanto efeitos colaterais como a nefrotoxicidade e a hipertensão arterial diminuía a qualidade de vida dos pacientes (LAMB, 2000; SCHAFER, 2001; HARJULA et al, 1995).

Um marco na terapia imunossupressora foi alcançado em 1983 com o desenvolvimento da ciclosporina uma droga mais seletiva e com menos efeitos colaterais transformando a tecnologia dos transplantes em uma terapia mais eficaz. A década de 80, por consequência, registrou aumento significativo no número de procedimentos e sobrevida de até 80% de no período de dois anos pós-transplante (PEREIRA, 2004).

Os avanços não cessaram e um importante aumento no número de procedimentos bem-sucedidos foi registrado nos anos seguintes. Uma prática que rapidamente ganhou espaço foi o transplante de medula óssea, sendo documentados mais de 50.000 casos até o ano de 1994. Esse interesse, em específico, se deu pela possibilidade dessa substituição ser capaz de devolver a qualidade de vida a pacientes de diversas imunodeficiências, leucemia, anemia aplástica, diferentes erros congênitos do metabolismo, e doenças geneticamente determinadas tais como a doença de Hodgkin (HARJULA et al., 1995).

2.2 CLASSIFICAÇÃO QUANTO À ORIGEM

Ao longo da história, os estudos e as práticas cirúrgicas ocorreram de forma ampla com diversificadas fontes doadoras de órgãos e tecidos. Por essa razão se fez necessária uma classificação quanto as diferentes relações entre doadores e receptores podendo ser autólogos, alogênicos, xenogênicos e aloplásticos.

O transplante autólogo corresponde à substituição de tecido danificado por enxerto proveniente do próprio receptor. Como é o caso de transplante de pele, em queimaduras pouco extensas, ou o procedimento cardiovascular conhecido como ponte de safena. Esse modelo de transplante tem como maior

vantagem a diminuição do risco de rejeição, no entanto, se limita a reparos de pequena extensão (KANENO, 2003).

Os transplantes alogênicos são os mais comuns na prática clínica, sendo o doador e o receptor geneticamente distintos, mas da mesma espécie. O aloenxerto pode ser doado por indivíduo vivo que possua ou não algum grau de parentesco com o receptor, mas que demonstre prévia compatibilidade genética. Esse procedimento é possível nos casos de transfusão, transplantes de células-tronco, fígado, rins ou medula óssea. Outra possibilidade do transplante alogênico e, a mais frequente ocorre por meio de doador falecido em decorrência de morte encefálica (KANENO, 2003).

O transplante xenogênico se configura por doador e receptor serem de espécies distintas. Essa alternativa é utilizada como meio de facilitar o acesso ao enxerto ou evitar cirurgias adicionais (possíveis autoenxertos) como ocorre na implantodontia que evita em muitos casos o autoenxerto e o substitui pelo enxerto ósseo liofilizado bovino (KANENO, 2003).

Os aloplásticos são enxertos confeccionados com materiais inorgânicos ou sintéticos e são o objeto de estudo do presente trabalho, discutidos com maior profundidade nas sessões seguintes (VIVIAN, 2017). No entanto, serão citados no momento para manter a ordem lógica das informações.

2.3 PROBLEMÁTICAS DO CENÁRIO ATUAL DOS TRANSPLANTES

Levantamentos realizados entre janeiro e setembro de 2019 pelo Registro Brasileiro de Transplantes de Órgãos (ABTO) , veículo oficial da associação brasileira de transplante de órgãos apresentaram dados desfavoráveis. Um total de 29.454 pacientes ingressaram em lista de espera que somados aos que já aguardavam em dezembro de 2018, totalizam 37.212 pacientes sendo 744 pacientes pediátricos e 36.468 adultos.

Em relação aos potenciais doadores, houve um aumento de 4,1% em 2019 relação a 2018, sendo registrados 8.469. Embora tenha havido aumento no cadastro de doadores, não houve aumento nas taxas de autorização dos familiares e o índice de doadores efetivos foi de apenas 2.775. Foi observado, devido ao baixo índice de efetividade de doadores, aumento de 3.014 adultos e

109 pacientes pediátricos em fila de espera em relação ao ano anterior, dados que corroboram para um índice de mortalidade em lista de espera de 1.713 pacientes até setembro de 2019 (ABTO, 2019).

O cenário nacional dos transplantes descrito é uma realidade também compartilhada em muitos países incluindo os mais desenvolvidos. Nos Estados Unidos mais de 113 mil pessoas, atualmente, esperam por um órgão, e 20 mortes são registradas diariamente em decorrência da espera por um órgão. Dados preocupantes que exigem soluções urgentes. Por esse motivo, alternativas são propostas como esperança para reverter esse quadro em todo o mundo (ODT, 2019).

O sucesso do procedimento do transplante de tecidos, células ou órgãos vai além das etapas já mencionadas, e sofre importante influência de respostas imunes, característica intimamente ligada à dificuldade na obtenção de compatibilidade entre doador e receptor.

Os organismos superiores possuem em seu material genético, uma região específica denominada complexo principal (ou maior) de histocompatibilidade (MHC). Localiza-se no braço curto do cromossomo 6 e está diretamente relacionada à defesa do organismo contra infecções pelo reconhecimento de antígenos próprios e externos (self e non-self) estando portanto, associados à sobrevivência do enxerto em longo prazo, e a reatividade imunológica que podem levar a rejeição (ABBAS, 2008).

Esse conjunto de genes é expresso codominantemente e corresponde à região mais polimórfica do genoma com milhares de alelos descritos, resultantes do mecanismo genético de recombinação somática, responsáveis pelos principais desafios impostos aos transplantes (com exceção dos autoenxertos), e explica a dificuldade na compatibilidade entre indivíduos geneticamente distintos (NUSSBAUM et al., 2008).

Em decorrência dessa “mistura” gênica, é possível dizer que as combinações possíveis na formação de anticorpos são infinitas, variabilidade explicada pela necessidade evolutiva de adaptação imunológica a diferentes agentes expostos ao organismo (ABBAS, 2012). Os genes do MHC codificam moléculas encarregadas da apresentação de antígeno na superfície celular e tem por função básica promover o reconhecimento dos peptídeos por linfócitos que pode ocorrer por duas vias distintas: citosólica e endolítica (ABBAS, 2008).

A via citosólica se caracteriza pela associação das moléculas de MHC de classe I, expressas em todas as células nucleadas, a peptídeos endógenos, gerados no citosol e ocorre a apresentação do antígeno na superfície celular para reconhecimento promovido especificamente pelo linfócito T CD⁸. Na via denominada endolítica, é feita a apresentação de antígenos exógenos por moléculas de MHC de classe II, expressas em células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (apresentadoras de antígenos). Os antígenos são produtos de fagocitose e reconhecidos por linfócitos T CD⁴ (ABBAS, 2008).

As duas vias estão relacionadas a mecanismos de rejeição distintos. A via citosólica é responsável pela ativação direta da rejeição do enxerto que se caracteriza pelo reconhecimento dos antígenos endógenos do doador (apresentados na superfície das células do enxerto) como não-próprios pelos linfócitos T CD⁸ do receptor. Já a endolítica se relaciona a uma resposta imunológica indireta por meio de fagocitose das células do enxerto, resultando em peptídeos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos do receptor aos seus linfócitos T CD⁴ (ABBAS, 2008).

Havendo o reconhecimento de antígenos estranhos, a rejeição e subsequente destruição do órgão pode ser desencadeada por três maneiras distintas: hiperaguda quando o sistema imunológico do receptor já é sensibilizado (apresenta anticorpos contra antígenos do MHC do doador) e desencadeia uma resposta mediada por anticorpos imediatamente após o transplante. Essa é forma menos comum de rejeição, mas a mais grave. A aguda é mais frequente e evidenciada no primeiro mês após o transplante, também se caracteriza como uma forma agressiva de rejeição e é mediada por linfócitos T. Por fim, a rejeição crônica, que ocorre após três meses, ocasionada por uma complexa interação de fatores celulares e humorais, podendo levar à insuficiência do órgão recebido (ABBAS, 2008).

Todos os conhecimentos adquiridos e aspectos observados ao longo da história dos transplantes, evidenciam um cenário que flutua entre a grande esperança de vida e a frustração da espera de milhares de pacientes em todo o mundo. Essa lacuna estimula, portanto, o desenvolvimento de alternativas na tentativa de reduzir as taxas de rejeição e suprir a falta de órgãos.

2.4 ENGENHARIA DE TECIDOS E BIOMATERIAIS

Os biomateriais apresentam registros de aplicação na medicina desde o ano 200 AC no antigo Egito, pela utilização de fios de linho e ouro em suturas, e estão presentes na prática clínica até os dias atuais nos tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise, substitutos ósseos, tendões, válvulas cardíacas, lentes, entre muitos outros (RATNER, 2013). Nas últimas décadas, os biomateriais têm sido utilizados como matéria-prima para engenharia de tecidos na produção de novos implantes, tecidos e enxertos capazes de substituir e regenerar regiões lesionadas do organismo (HEATH e COOPER, 2013).

A engenharia tecidual desenvolveu-se pela intersecção de conhecimentos da engenharia de materiais e das ciências biológicas resultando em uma biotecnologia com emergente potencial de aplicação em diversas áreas da saúde. O desenvolvimento dessa ciência potencializada com os recentes conhecimentos da engenharia genética e da terapia celular permitiu o surgimento de várias possibilidades de produtos inovadores capazes de auxiliar na medicina regenerativa, na distribuição de fármacos, e na possibilidade de produção de órgãos sintéticos para transplantes (MARYCZ et al., 2014).

A produção de novos produtos para a medicina regenerativa por meio da bioengenharia se dá, primeiramente, pelo estudo de biomateriais naturais ou sintéticos que podem ainda ser combinados formando biocompósitos (RATNER, 2013). Existe, portanto, uma grande variedade de biomateriais assim como diferentes aplicações e formas de interação com o organismo. Por essa razão, faz-se necessário elucidar que, no escopo do presente trabalho, os biomateriais serão referidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, com aplicações cirúrgicas ou terapêuticas, de origem sintética ou natural, na forma de sólidos e géis.

Esse grupo especial de materiais é aplicado à engenharia de tecidos para compor os enxertos aloplásticos, e podem ser classificados quanto ao comportamento biológico. A permanência de qualquer material distinto física e geneticamente do organismo em que se encontra será reconhecido como corpo estranho e ocorre, como consequência, o desencadeamento de uma resposta imunológica que tende a expulsar o material, assim como ocorre com tecidos

biológicos transplantados. Com os biomateriais, essa reação pode levar à sua corrosão ou degradação com liberação de toxinas, e consequente perda de função (HENESS e BEN-NISSAN, 2004).

Por essa razão, se faz necessário o desenvolvimento de biomateriais que não provoquem danos aos tecidos vivos adjacentes. Tal característica confere ao biomaterial a propriedade de biocompatibilidade. Dentre todas as interações, a classificada como biocompatível é a ideal por garantir maior eficiência mecânica e biológica do material implantado (SRIVASTAV, 2011).

Os bioinertes formam o grupo de enxerto aloplástico incapazes de interação com o organismo não induzindo, portanto, diferenciação celular ou qualquer alteração no tecido implantado. Biotoleráveis são biomateriais que induzem a formação de uma capsula protetora ao seu redor, gerada pelo organismo, para evitar reações imunológicas que podem levar à rejeição da prótese ou implante. Os bioativos são caracterizados por materiais que possuam ligações iônicas com fosfato e cálcio estando, por esse motivo, relacionados à osteoindução de células em contato com o enxerto. Por fim, os materiais reabsorvíveis ou bioabsorvíveis, são capazes de serem degradados e eliminados pelo organismo, sendo gradativamente substituídos pelo tecido original (SINHORETI, 2013).

Inicialmente, a abordagem de desenvolvimento e aplicação dos biomateriais era fundamentada na busca de materiais bioinertes, com principal intenção de conferir suporte mecânico e nenhuma interação com o organismo hospedeiro. A partir da década de 1950, passaram a ser aplicados com enfoque mais sistematizado e iniciaram-se as buscas por materiais biotoleráveis com interesse no aumento da vida útil do implante por meio da interação entre a superfície do biomaterial e o tecido que o envolve (RATNER, 2013).

Posteriormente, os biomateriais bioativos e bioreabsorvíveis começaram a ser investigados com foco na regeneração tecidual e na recuperação de função do tecido danificado, visando uma interação pré-definida e esperada com o organismo hospedeiro, assim como a degradabilidade do material em período estimado e desejável (RATNER, 2013). Porém, a busca por soluções ainda mais efetivas, instiga a bioengenharia a superar barreiras e alcançar resultados tidos até então, como improváveis.

2.5 BIOMIMÉTICA

A biomimética é uma ciência inspirada na natureza - o maior, mais eficiente e antigo laboratório de testes existente – e surge com intuito de mimetizar os organismos e o meio ambiente da maneira mais precisa possível. Por mais de 3.8 bilhões de anos todas as espécies sofrem constantes adaptações estruturais e moleculares como efeito da seleção natural que resulta no modelo biológico mais perfeito possível, esculpido evolutivamente (RUANO, 2019).

A ciência vive uma fase de avanços significativos no desenvolvimento de técnicas capazes de manipulação gênica precisa e impressão de tecidos funcionais pela tecnologia da bioimpressão. A convergência dos avanços científicos com bilhões de anos de evolução das espécies marca o início de uma nova geração de materiais destinados à bioengenharia, os biomiméticos, biomateriais e modelos de estudo (*scaffolds* ou arcabouços) com essa tendência (HOLZAPFEL et al., 2013).

A engenharia tecidual passa, portanto, a contar com protótipos e produtos cada vez mais semelhantes aos modelos naturais pela combinação delineada de elementos celulares, fatores de proliferação, potenciais indutores de diferenciação celular, e estimuladores de geração de novas células em quantidade suficiente para regeneração tecidual, além de estruturas supramoleculares que conferem organização espacial e geração de novos tecidos, ancorando células em uma arquitetura funcional e garantindo a sua integração sistêmica (DANTI et al., 2013).

2.6 BIOMATERIAIS – NATUREZA E PROPRIEDADES

Os biomateriais podem ser classificados em relação à interação com o organismo, quanto a origem (sintética ou natural), como já mencionado, e podem, ainda, ser divididos em grupos específicos conforme a composição química que conferem a eles propriedades específicas e infinitas possibilidades de obtenção de novos produtos. A estrutura física é uma das características principais dos biomateriais e os divide em dois grupos sendo os biomateriais de

sustentação representados pelos implantes metálicos, polímeros não-degradáveis e silicones (elastômero), e os biomateriais integráveis que podem ainda formar dois subgrupos: mineralizados, representados pelos biocerâmicos e materiais ósteo-miméticos, e os elásticos, representados pelos polissacarídeos, polímeros de carboidratos, proteínas estruturais e materiais condro-miméticos (Pires et al., 2015).

As propriedades estruturais são, frequentemente, uma limitação para aplicação dos biomateriais de maneira individualizada. Os que possuem capacidade de sustentação são frágeis e não permitem moldagem. Os elásticos, que podem ser moldados, possuem pouca estabilidade estrutural. Portanto, há um crescente interesse na formulação de novos biocompósitos, resultantes da união entre diferentes tipos de biomateriais, para aprimoramento das propriedades mecânicas e estruturais (Pires et al., 2015).

Alguns critérios devem ser considerados antes da escolha de um biomaterial, pela elevada diversidade de produtos e propriedades específicas de cada um deles. Na sequência, serão apresentados os grupos de biomateriais que formam o biocompósito desenvolvido no presente estudo, assim como a abordagem das principais características apresentadas por eles, de acordo com a literatura.

2.7 BIOPOLÍMEROS

As características de cada material polimérico mudam conforme o padrão de disposição das unidades monoméricas. A existência de grupos funcionais ligados à cadeia principal, polaridade e rigidez, outras forças atuantes como a interação de Van der Waals, são fatores que influenciam nas características de cada biopolímero e, por consequência, os predestinam para cada possível aplicação. Outro ponto importante a ser considerado no direcionamento da aplicação de um biopolímero é o potencial de degradação e a elucidação do período da reação (WONG ; BRONZINO, 2007).

Os polímeros sintéticos são amplamente utilizados nos produtos para a saúde por apresentarem facilidade de obtenção, serem facilmente manipulados e terem, geralmente, baixo custo. São formados principalmente por poliamidas, polietileno, polipropileno, poliuretano, poliéster fluorocarbonos, entre outros. No

entanto, esse grupo polimérico pode apresentar grupos químicos que desfavorecem o crescimento celular e liberar subprodutos tóxicos durante a sua degradação, aumentando a possibilidade de rejeição (Heath e cooper, 2013 ; TIAN et al., 2012).

Os polímeros de origem biológica por outro lado, apresentam-se como produtos não-tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, características que os tornam potencialmente mais seguros para utilização na engenharia de tecidos. São provenientes de fontes renováveis e, geralmente, apresentam menor custo em comparação aos sintéticos. No entanto, sua obtenção pode ser dificultada pela necessidade de purificação e pelo produto sofrer influência do meio, podendo gerar variabilidade na qualidade e nas propriedades desejáveis. Podem ser extraídos de plantas, microrganismos, algas e animais (Pires et al., 2015).

Apesar dessa limitação, os biopolímeros naturais têm sido utilizados no desenvolvimento de produtos para aplicação biomédica, destacando-se os produtos provenientes de colágeno, fibrina da seda, elastina, quitosana, goma xantana, ácido hialurônico e, mais recentemente, a goma gelana, sendo aplicados no tratamento de feridas, liberação controlada de fármacos e bioimpressão de tecidos. A biodegradabilidade desses materiais é dependente das atividades enzimáticas, fator que possibilita o aumento da taxa de metabolização pelo organismo. Além dessa vantagem, os biomateriais naturais possibilitam a fabricação de estruturas semelhantes à matriz extracelular (Pires et al., 2015).

Os biomateriais de origem polimérica são formados por macromoléculas que possuem alta massa molar e ligações covalentes entre unidades repetitivas (meros) que dão origem à cadeia polimérica, resultante de uma reação sintética ou natural (polissacarídeos). Biopolímeros têm sido os mais utilizados como arcabouços na engenharia de tecidos pelas suas características mecânicas, de biocompatibilidade e de biodegradabilidade. Muitos polímeros termoplásticos apresentam a capacidade de formar hidrogéis em resposta às mudanças de temperatura, característica que os tornam particularmente úteis para aplicações biomédicas por meio da bioimpressão 3D (Pires et al., 2015 ; STEVENS et al., 2016).

Os biomateriais em geral, podem ser aplicados integrados ou não com células. Os hidrogéis formados por polissacarídeos, pela possibilidade de

extrusão em conjunto com células, apresentam características favoráveis a esse processo, sendo a principal delas a capacidade de gelificação em temperaturas amenas, conferindo segurança para a viabilidade celular. Dessa forma, os implantes sintéticos podem ser associados às atividades celulares do próprio indivíduo, além de apresentarem vantagens na sua utilização pela sua disponibilidade e reprodutibilidade (PARK et al., 2017).

As redes hidrofílicas que formam os hidrogéis fornecem estrutura com alta porcentagem aquosa que mimetiza as matrizes extracelulares nativas, especialmente os que são à base de polissacarídeos biocompatíveis (como a goma gelana, alginato e quitosana), o que favorece a promoção de adesão e proliferação celular. Os hidrogéis apresentam ainda, a possibilidade de encapsulamento de células e incorporação de moléculas, fármacos e bioativos. Além dessas vantagens, a forma gelatinosa dos hidrogéis possibilita a aplicação direta em locais alvo na aplicação terapêutica, utilizando dispositivos injetáveis, uma propriedade exclusiva desse grupo (ROTTENSTEINER-BRANDL, 2018).

A goma gelana (GG), forma um hidrogel estável em contato com cátions. É um heteropolissacarídeo natural secretado por bactérias pertencentes ao gênero *Sphingomonas*, constituído por uma cadeia linear de unidades consecutivas de tetrassacarídeos (L-ramnose, D-glicose e ácido D-glucurônico). A GG é um biopolímero de fácil obtenção fabricado comercialmente *in vitro* por fermentação em processo controlado, excluindo a possível variabilidade entre lotes distintos, como ocorre com outros biopolímeros de origem natural que sofrem influência do meio como já mencionado anteriormente. Essa estabilidade torna a utilização da GG favorável à aplicação na bioengenharia por garantir maior segurança para fabricação de produtos destinados à saúde (GRAHAM; MARINA; BLENCOWE, 2019).

A GG é comercializada em duas formas distintas, a de alto acil e de baixo acil. A forma natural é a de alto acil, contendo dois grupos acila em sua estrutura, ambos localizados no mesmo resíduo de glicose. A forma de baixo acil é obtido após a retirada dos grupos acila por hidrólise alcalina. Ambas as estruturas apresentam estrutura espiralada desordenada quando submetidas à elevação de temperatura e, quando resfriadas, se apresentam ordenadas em estrutura de dupla hélice. A diferença química entre as duas apresentações possíveis de GG estão intimamente ligadas às diferentes características dos hidrogéis formados.

A presença do grupo acila, resulta em hidrogéis macios e não-quebradiços, pela localização na periferia da hélice, impedindo o empacotamento das cadeias poliméricas. Por outro lado, o hidrogel resultante da GG modificada é firme e não elástico, pois a ausência de grupos acila permite a formação de uma rede polimérica ramificada (VIEIRA et al., 2019).

A gelificação da GG sofre influência do meio, principalmente pela natureza dos cátions presentes, sendo que a interação com cátions bivalentes resulta na gelificação mais intensa do que com cátions monovalentes (STEVENS, 2016). As estruturas da GG têm excelente resistência ao calor porque as junções formadas após a gelificação só podem ser destruídas em temperaturas acima de 120°C (Miyoshi et al., 1996). Estudos anteriores indicam que soluções de GG desacetilada se comportam como líquidos pseudoplásticos, tendo sua viscosidade diminuída pelo aumento da tensão cisalhante aplicada e têm pouca tixotropia que é a capacidade de mudança do estado de gel para o estado sólido (Deasy et al., 1991).

A hipótese de aplicação da GG na medicina tem sido avaliada com maior frequência nos últimos anos, pelo aumento de pesquisas que demonstram sua biocompatibilidade e processamento sob condições moderadas. As destinações de possíveis produtos mencionados exploram, em sua maioria, o campo de liberação controlada de fármacos e de moléculas bioativas. Também se considera a hipótese de aplicação na oftalmologia pela característica transparente do hidrogel, possibilitando a produção de córnea ou lentes. A GG apresenta uma peculiaridade favorável à aplicação na regeneração de tecido cartilaginoso pela semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos nativos da cartilagem, devido à presença dos resíduos de ácido glicurônico em sua unidade de repetição. Além disso, outras inúmeras possibilidades podem ser levantadas, quando a GG é integrada a algum outro biomaterial, formando um biocompósito (OLIVEIRA et al., 2010 ; MOUSER et al., 2016).

2.8 VITROCERÂMICOS

Os vitrocerâmicos ou vidros bioativos (BG), foram descobertos em 1969 pelo professor Larry Hench e tiveram a primeira aplicação clínica em 1985. Foram os primeiros materiais sintéticos a demonstrar capacidade de interação

com os tecidos conjuntivo e ósseo. São compostos inorgânicos que têm mostrado, portanto, uma forte tendência à aderência ao tecido ósseo, osteoindução e osteocondução (WANG e YEUNG, 2017). Isso ocorre pela formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada quando o BG é implantado, gerando uma forte interação por força de adesão interfacial com o tecido ósseo.

A osteoindução e osteocondução são mais pronunciadas nos implantes a base de biovidros do que naqueles fabricados em hidroxiapatita (HA). Estudos comparativos entre o índice de bioatividade em relação ao tempo necessário para que 50% da superfície se integre às células do tecido, mostram um valor de relativo à bioatividade de 12,5 para o BG e 3,1 para a HA. Em relação ao tempo do material implantado, os valores da bioatividade representam 32 dias para que 50% da superfície da HA apresente interação celular, e apenas 8 dias para o biomaterial formado por BG (PIRES et al., 2015).

O vitrocerâmico usado no presente trabalho (BR 10 2016 003703 4) é considerado um material inteligente por sofrer degradação acelerada em meio ácido e mais controlada em meio alcalino ou neutro. Este material possui, em sua composição, elementos reconhecidamente biocompatíveis. Sua não toxicidade, observada por meio de ensaio de adesão celular *in vitro*, estimulou a pesquisa em relação à possibilidade de seu uso como biomaterial em aplicações onde a sua degradação no organismo é importante. Sua biocompatibilidade foi comprovada em ensaios *in vivo* anteriores e, devido à sua facilidade de fabricação em formas complexas, existe a possibilidade de sua aplicação como enxertos e arcabouços para cultura de células ósseas visando à reconstrução de grandes defeitos em ossos (FERNANDES et al., 2008; SOUSA et al., 2012).

Os materiais à base de vitrocerâmicos possuem, como limitações nos processos de fabricação de peças, a rigidez que dificulta a sua usabilidade pela possibilidade de ocorrer microfaturas no material que fragiliza o implante em serviço, principalmente quando sujeito à cargas cíclicas como as sofridas pelos ossos. Essa característica também impossibilita sua aplicação isolada como matéria-prima para bioimpressão de enxertos e próteses personalizadas (PIRES et al., 2015).

A junção de materiais de classes distintas forma um compósito. Quando os materiais são biocompatíveis, dão origem a um biocompósito, com o intuito

de modificações e aprimoramento das propriedades, como já abordado em anteriormente. As propriedades dos biocompósitos resultantes dependem das características de cada constituinte, da porcentagem de cada um, da forma como são distribuídos, e da conformação que as fibras se dispõem. Os biocompósitos apresentam uma fase contínua que é chamada de matriz e uma dispersa que, após serem incorporados, conferem propriedades específicas ao novo composto. Propriedades estas, passíveis de ajustes que conferem mudanças significativas no resultado final mudando-se apenas a proporção de cada material, possibilitando várias aplicações distintas de uma mesma mistura de biomateriais (PIRES et al., 2015).

2.9 CÉLULAS-TRONCO

As células tronco mesenquimais têm como principal fonte de isolamento a medula-óssea e são reconhecidas pela literatura como as células com maior potencial de aplicação na engenharia de tecidos. Essa preferência se dá pela capacidade de autorrenovação, multipotencialidade de diferenciação celular (plasticidade), por serem indiferenciadas, e apresentarem baixo potencial imunogênico aliado à propriedade imunomodulatória, possibilitando sua aplicação em transplantes alogênicos. Além disso, são de fácil obtenção e proliferação *in vitro*, podendo ser isoladas por diversas fontes do próprio paciente (BYDLOWSKI et al., 2009).

Células tronco podem ser encontradas nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos. Estudos relatam isolamento de células-tronco provenientes de diferentes tecidos como medula óssea (PITTENGER et al., 1999), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), sangue de cordão umbilical (ZHANG et al. , 2004) geleia de Whorton (WANG et al.,2004) e, recentemente, de tecido de cordão umbilical (VAN PHAM et al., 2016).

As células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea, também conhecidas como esqueléticas, sofreram mudança na nomenclatura sugerida pela International Society for Cytotherapy, passando a serem nomeadas células estromais mesenquimais multipotentes (CMM) por estarem presentes no estroma da medula óssea e serem capazes de diferenciação em várias linhagens

de células do tipo mesodérmico. Existe a hipótese ainda não comprovada do potencial de diferenciação natural em células neurais ou hepatócitos. No entanto, já foi evidenciado o potencial osteogênico, condrogênico, adipogênico, neurogênico e cardiogênico, das CMM quando submetidas à estimulação (LOTT et al., 2004 ; GALIPEAU et al., 2016 ; BYDLOWSKI et al., 2009).

2.10 BIOTINTAS

A engenharia de tecidos pode ser aprimorada pela utilização das células agregadas aos biomateriais e alcançar o objetivo da biomimética, principalmente quando esse conjunto é passível de extrusão, ou seja, compatível com a tecnologia de bioimpressão 3D, sendo assim chamado de biotinta, ou do inglês *bioink* sendo, frequentemente, desenvolvidas em forma de hidrogel.

Os hidrogéis aplicados como biotintas se distinguem dos biomateriais em geral, pela capacidade de permitir a migração livre e a proliferação celular em seu interior para conduzir a reparação tecidual. Ao contrário de biomateriais como termoplásticos, cerâmicas e metais, as biotintas a base de hidrogel são processadas e depositados em condições amenas de temperatura, pressão e pH, tornando segura a bioimpressão sem que haja degradação de moléculas bioativas e morte celular (JI et al., 2017).

Uma biotinta ideal deve possuir viscosidade compatível com a extrusão, cinética de gelificação favorável, biocompatibilidade, capacidade de hidratação e viscoelasticidade. Dessa forma, a nova geração de enxertos e tecidos produzidos pela engenharia de tecidos possibilita o desenvolvimento de uma medicina regenerativa cada vez mais individualizada e precisa, pensando não apenas na aplicação, mas em entregar ao paciente um produto personalizado e com a sua própria identidade celular (JI et al., 2017).

A impressão 3D aplicada à medicina regenerativa, oferece uma rápida e robusta abordagem de fabricação de tecidos potencialmente viáveis e funcionais. Possibilita, por meio de deposição de biotintas assistida por computador e por imagens médicas, uma delimitação estrutural precisa que dá origem às estruturas altamente complexas que, juntamente com as propriedades das biotintas constituintes, resultam em um enxerto impresso personalizado capaz de oferecer suporte estrutural, fornecer moléculas e suprimentos aos

tecidos, assim como possibilitar e estimular a interação com o organismo. A tecnologia de bioimpressão é capaz de criar múltiplos padrões de impressão que permitem, simultaneamente, a preservação da função e viabilidade celular (OZBOLAT e YIN YU, 2013).

O processo de biofabricação envolve três etapas básicas, primeiramente o pré-processamento e a definição do projeto por meio da captura da imagem de ressonância magnética computadorizada ou raio-x, e editoração em software CAD. Posteriormente, a imagem é definida como padrão de impressão, delimitando-se as camadas com as respectivas biotintas e ocorre a biofabricação de fato pela técnica de bioimpressão mais adequada. Por fim, o pós-processamento com a finalidade de maturação e monitoramento do órgão ou tecido. Dentre as técnicas mais utilizadas para essa finalidade, se destacam as bioimpressões com base nas tecnologia à laser, com jato de tinta e por extrusão (LI et al., 2016).

A tecnologia à laser foi utilizada pela primeira vez em 1999 e se baseia na deposição celular em um substrato que recebe feixes de laser precisamente direcionados, com a finalidade de excitar as células e organizá-las espacialmente. O pulso de laser forma bolhas que deslocam as células de maneira a definir a estrutura camada a camada. Posteriormente nova deposição de hidrogel ocorre no topo da lâmina anterior, e o processo se repete até obtenção da estrutura programada. É uma técnica capaz de criar tecidos com rapidez e com padrões precisos, mantendo a viabilidade celular (OZBOLAT e YIN YU, 2013).

A bioimpressão com jato de tinta surgiu em meados dos anos 2000. Faz a deposição do hidrogel por meio de gotículas, seguindo os dados enviados via sistema computadorizado com base em imagens, assim como a tecnologia de laser. Permite a impressão de células vivas carregadas por hidrogéis, células individuais e aglomerados de células, com controle de parâmetros como a concentração de células, volume de queda, e diâmetro do bico de deposição (OZBOLAT e YIN YU, 2013).

Outra técnica potencialmente empregada na produção de órgãos é a extrusão. Ocorre por meio de deposição de filamentos de hidrogéis injetados de maneira contínua carregados de células. Durante a bioimpressão por extrusão, o biomaterial é distribuído por processo controlado de pressão que resulta na

deposição de células encapsuladas, precisamente envolvidas por filamentos cilíndricos do hidrogel. O processo é contínuo até que se conclua a construção do produto desejado. (GUVENDIREN, 2016)

O pós-processamento se configura pela maturação do produto impresso em biorreatores. Nessa fase, o tecido vivo ou órgão fabricado no intuito de mantê-lo sob monitoramento de condições de pH, temperatura, pressão, fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos, semeadura de células, nutrição de células nas construções resultantes e estimulação mecânica, para manter a viabilidade e atividades metabólicas mimetizadas por esse processamento (OZBOLAT e YIN YU, 2013 ; STEVENS et al., 2016).

2.12 PRINCIPAIS APLICAÇÕES DA BIOIMPRESSÃO

Os produtos de bioimpressão tem mostrado potencial de aplicação principalmente destinada à reconstrução de cartilagens, ossos, coração, tecido nervoso hepático e vasculares. Os tecidos cartilagosos e ósseos apresentam o maior número de estudos já desenvolvidos pela bioengenharia, por envolver bioimpressões menos complexas se comparadas aos demais tecidos. São tecidos que permitem substituição por construções geometricamente precisas com função específica estrutural (LEE et al., 2013). O tecido cartilaginoso traz a vantagem de fácil aplicação de hidrogéis por injeção diretamente no local lesionado como relatado por Onofrillo e sua equipe (2018) que desenvolveram uma caneta injetora para reparo da cartilagem *in situ*. Dentre as áreas que se beneficiam com os bioprodutos de impressão óssea e cartilaginosa, estão principalmente a ortopedia, otorrinolaringologia e bucomaxilofacial.

O ouvido médio pode ser afetado por várias patologias, principalmente perfurações timpânicas que levam a complicações funcionais e prejudicam a audição. Nesse sentido, estudos de novos biomateriais aplicáveis à reconstrução de ossículos nessa região são fundamentais para a proteção da membrana timpânica. O grupo de pesquisa italiano da universidade de Pisa trabalha no desenvolvimento de arcabouços para ossiculoplastia. Em 2009, obtiveram sucesso na produção de um substituto com característica muito similar ao ossículo natural com porosidade e propriedades mecânicas apropriadas para a colonização celular e a maturação osteoblástica *in vitro*. O ossículo sintético foi

fabricado a base de poli (propileno fumarato)/poli (propileno fumarato)-diacrilato (PPF / PPF-DA) que mostrou biocompatibilidade por meio da comprovação da viabilidade celular e osteoindução por expressão dos principais marcadores osteogênicos (fosfatase alcalina, cálcio), e de várias biomoléculas da matriz celular (glicoproteínas, glicosaminoglicanos, colágeno I) (DANTI et al., 2009).

Em 2013, bioengenheiros da Califórnia obtiveram resultados satisfatórios na prototipagem rápida pela impressão 3D baseada em imagens médicas processadas por CAD para produção de arcabouços miméticos de mandíbula para reconstrução específica a cada paciente. A biotinta utilizada foi um hidrogel à base de policaprolactona e quitosana. Após a impressão, o arcabouço passou por revestimento da superfície com uma camada de apatita bioativa. O material resultante foi uma prótese biodegradável personalizada com capacidade osteoindutora (LEE et al., 2013).

A cartilagem articular apresenta difícil auto-reparação e o número de pacientes com lesões nesse tecido é crescente em todo o mundo. Os procedimentos cirúrgicos tradicionais são limitados e incapazes de reverter o dano tecidual. Com objetivo de preencher essa lacuna, um estudo recente desenvolveu um modelo promissor para a regeneração de cartilagem usando populações mistas de células-tronco e condrócitos em modelo de co-cultivo ancorados por hidrogel poroso. O hidrogel era formado por gelatina microribbons (μ RBs) e preenchido com hidrogel degradável de sulfato de condroitina nanoporoso (CS) 6%. Quando implantados em um modelo subcutâneo de camundongo, o arcabouço induziu aumento da espessura da cartilagem. Em estudo comparativo com cultivo de apenas condrócitos no hidrogel, o co-cultivo celular apresentou resultados mais satisfatórios. Verificou-se uma deposição mais intensa de colágeno distribuída de maneira interconectada, sugerindo esse modelo para aplicações em geral em tecidos cartilagosos (ROGAN et al., 2020).

Uma aplicação peculiar dos hidrogéis é a possibilidade de atuação como carreadores de fármacos, bioativos e células encapsuladas. Um exemplo dessa aplicação é o estudo da equipe de pesquisadores liderada por Hairui Suo em estudo com hidrogel à base de goma gelana como carreadora de glucosamina (GlcN). Esse amino monossacarídeo de ocorrência natural, tem sido amplamente utilizado para reduzir a dor nas articulações e mostrado eficácia na

inibição da progressão da osteoartrite. No entanto, sua administração, tradicionalmente feita por via oral, não alcança absorção suficiente, resultando em baixa concentração de GlcN na cavidade articular. A atividade do monossacarídeo, foi potencializada pela equipe chinesa por meio de aplicação por injeção *in situ* (SUO, et al., 2019).

Essa mesma estratégia foi utilizada na produção de carreadores na fase de hidrogel à base de dextrana que demonstrou citocompatibilidade eficaz para aplicação em áreas gerais biomédicas. Em outro estudo, o hidrogel utilizado foi composto por alginato e ácido adípico. Foi demonstrada a capacidade de encapsulamento celular aplicado como carreador, e sugerida aplicação em terapias celulares por permitir sobrevivência das células e sua liberação progressiva, podendo também ser utilizado como carreador de fármacos pela mesma cinética de entrega e liberação (QU et al., 2019).

Outra aplicação de hidrogéis de grande interesse da bioengenharia é na oncologia, pela capacidade desses materiais de mimetizar as estruturas tridimensionais (3D) naturais, como já mencionado, e permitir a reprodução *in vitro* da interação das células tumorais com outros tipos celulares e com a matriz extracelular circundante (MEC), cada vez mais fidedigna. Essa reprodução é extremamente útil no estudo da resposta tumoral à terapias por reprodução biomimética de estrutura trabecular do parênquima hepático. Isso foi conseguido pelo cultivo celular de hepatocarcinoma, HepG2, em um hidrogel bioartificial composto de poli (álcool vinílico) (PVA) e gelatina para modelar um carcinoma hepatocelular em modelo tridimensional. As células se mostraram metabolicamente ativas, se dispuseram em grandes aglomerados, e foi observada morfologia distinta entre células da superfície e as células internas (MOSCATO et al., 2015).

Elucidações como essa são importantes para o entendimento dos aspectos biológicos do tumor como migração celular, mecanismo metastático, assim como a cinética de interação com medicamentos utilizados atualmente, e para o desenvolvimento de novos, mais eficazes. Outra estratégia para aplicação oncológica foi o desenvolvimento de um arcabouço multifuncional aplicado ao tratamento do câncer de mama e reconstrução tecidual pós retirada do tumor, desenvolvida por um grupo de pesquisadores chineses. O modelo terapêutico foi produzido por alginato e polidopamina, resultando em um hidrogel compatível

com impressão 3D que demonstrou capacidade de prevenção de recorrência, e indução à morte de células tumorais em testes *in vivo* (MOSCATO et al., 2015).

O tecido neural também é um possível beneficiado pela aplicação de hidrogéis. As cirurgias na coluna vertebral, podem levar a complicações decorrentes da cicatrização pós-cirúrgica, como a compressão neural e dor. Um procedimento que apresenta possibilidade da ocorrência de adesão cicatricial extensa, principal motivo da compressão nervosa, é a laminectomia que consiste na retirada de uma ou mais laminais vertebrais. Uma pesquisa com foco em evitar a adesão cicatricial pós-cirúrgica avaliou o efeito da aplicação de hidrogel injetável formado por ácido hialurônico combinado a goma gelana. Como resultado, foi observada uma propriedade anti-adesiva do biocompósito que sugerem a eficiência na formação de uma barreira gelatinosa que evite a adesão cicatricial. No entanto, estudos *in vivo* devem ser realizados para a confirmação dos achados (CENCETTI et al., 2011).

2.13 AVANÇOS E LIMITAÇÕES NA BIOIMPRESSÃO DE ÓRGÃOS

A biopressão de órgãos envolve processos complexos que exigem constante desenvolvimento. Vale ressaltar que essa é uma solução emergente com grande potencial de aplicação na medicina regenerativa e no cenário dos transplantes. No entanto, atualmente, é ainda tida como uma proposta de solução futura possível, mas ainda não acessível. Os resultados reportados na literatura são ainda escassos no que se refere à produção efetiva de órgãos e tecidos. No entanto, na última década foi crescente o número de pesquisas e de resultados satisfatórios. Algumas barreiras foram também superadas durante esse período, como o desenvolvimento de estratégia para impressão de tecidos vascularizados, que era tida como uma das maiores limitações para a bioengenharia de tecidos. Nesta sessão, será apresentada a contextualização do cenário atual com as principais limitações ainda impostas e avanços já alcançados.

Cientistas americanos em 2014 foram pioneiros na construção de um tecido vascularizado. A estratégia para construção de canais no interior do arcabouço impresso se baseou na utilização de hidrogéis com propriedades distintas sendo três deles hidrogéis de sustentação e um hidrogel com

propriedade específica chamado de Pluronic F127. Este último, conhecido como hidrogel fugitivo, foi utilizado para preencher as cavidades formadas pela deposição integrada com os outros hidrogéis. Esse hidrogel se difere dos demais por se apresentar em forma de gel no momento que é impresso e se liquefazer quando submetido a resfriamento de 22°C para 4°C (condição que não altera a fase geleificada dos demais hidrogéis) sendo expulso das cavidades após o término da impressão e deixando cavidades ocas, que foram posteriormente semeadas com células epiteliais (KOLESKY et al., 2014).

A possibilidade de vascularização impulsionou outros avanços importantes como a produção de um mini coração (altura: 20 mm; diâmetro: 14 mm) funcional por pesquisadores Israelenses em 2019 pela utilização de células-tronco provenientes de tecido adiposo, e modificadas em cardiomiócitos. Posteriormente, as células foram misturadas com a biotinta e submetidas à bioimpressão por extrusão integrada a outro hidrogel fugitivo, mas diferente do Pluronic F127, se liquefaz em 37°C, durante o processo de incubação, pós biofabricação. A funcionalidade do mini-coração foi comprovada medindo os transientes de cálcio em contração, apresentando propagação do sinal excedente 10 cm/s. No entanto, algumas limitações são levantadas no estudo. A produção de órgãos em maior escala, em dimensões reais, ainda é uma perspectiva futura pela necessidade de número de células significativamente mais elevado (NOOR et al., 2019).

A aplicação dessa tecnologia é dependente de padrões regulatórios, ainda não estabelecidos devido ao seu caráter inovador e constante desenvolvimento de estratégias ainda em fase de teste. Se faz necessária a elaboração de um manual de boas práticas específico à bioimpressão com delimitações como testes específicos exigidos para a comprovação da biocompatibilidade dos biomateriais, sistemas de manufatura aditiva aceitas, assim como parâmetros de fabricação segura, como boas práticas de fabricação (BPF). Necessita-se, ainda, de processos seguros de esterilização, métodos analíticos direcionados para a detecção de impurezas, e um rígido controle de qualidade. Maior compreensão de mecanismos celulares, do controle sobre o processo de diferenciação celular específica, assim como aprimoramento das tecnologias aplicáveis à produção e maturação de órgãos são necessários, embora existam modelos de estudos promissores em várias áreas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O material de estudo foi o biocompósito hidrogel-vitrocerâmico L2F registrado como patente de invenção (BR 10 2019 014592 7). A partir desta parte do documento, o biocompósito patenteado será referenciado como L2F.

3.1 MATERIAIS

Os biomateriais foram obtidos individualmente, sendo as peças de vitrocerâmico ($\text{CaAl}_2\text{Si}_2\text{O}_8$), fabricadas de acordo com o processo constante na patente registrada (BR 10 2016 003703 4) seguindo um procedimento de fusão e de cristalização. A mistura dos pós-componentes do vitrocerâmico em quantidades específicas protegida por patente - alumina (Al_2O_3), sílica (SiO_2) e calcário (CaCO_3) - foi realizada usando-se giramoinho horizontal (DESTIL) em meio úmido durante 3 h. Em seguida, a mistura de pós foi deixada em descanso durante 3 h para eliminar o excesso de umidade. Após esse processo, foi transferida para cadinhos de alumina de 100 ml com, aproximadamente, 100 g por cadinho, medidas em Balança Marte modelo AS2000C ($\pm 0,01$ g). Posteriormente, o cadinho contendo a mistura de pós à temperatura ambiente foi levado ao forno Yung modelo 0616, o qual foi aquecido com rampa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ e mantido por 5 horas na temperatura aproximada de $1300\text{ }^\circ\text{C}$ para fusão completa do pó. O cadinho contendo o material vítreo fundido foi rapidamente retirado do forno e vertido sobre a matriz em aço inoxidável 304, mantida aquecida para a conformação de uma pastilha. Depois de vertido, o material foi prensado manualmente e durante este processo, solidificou-se formando uma partilha vítrea.

A pastilha vítrea foi, então levada a uma mufla de $1200\text{ }^\circ\text{C}$ (EDG 1200) com rampa de aquecimento de $6\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até cerca de $920\text{ }^\circ\text{C}$, com resfriamento dentro do forno, formando a pastilha vitrocerâmica mostrada na figura 1.



Figura 1. Pastilha cristalizada do vitrocerâmico.

Para utilização no biocompósito, a pastilha de vitrocerâmico foi moída em giramoinho horizontal (DESTIL) e transformada em pó (Figura 2).

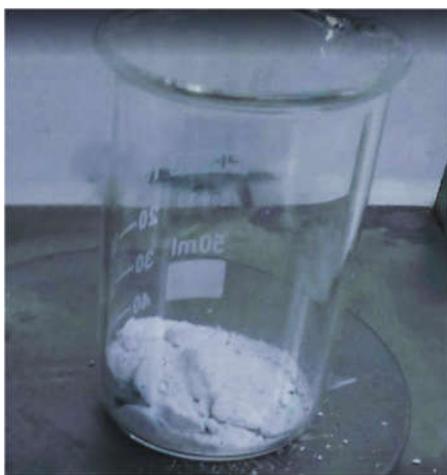


Figura 2. Vitrocerâmico em pó.

A goma gelana foi adquirida por doação do fabricante (Sunset): 50 g de goma gelana de alto acil, e 50 g de goma gelana de baixo acil, ambos em forma de pó.

3.2 FABRICAÇÃO DO BIOCAMPÓSITO

Para a produção do L2F, inicialmente foi realizado um estudo de proporções para obtenção da melhor concentração dos biomateriais por meio de combinações entre as concentrações de goma gelana instruídas pelo fabricante (entre 5 e 20%), para ambas as formas químicas, com proporções do

vitrocerâmico variando entre 1 e 10%. O teste de concentrações foi feito pela pesagem da goma gelana referente a cada concentração adicionados à água deionizada com agitação manual até dissolução completa do pó. Posteriormente, foram realizadas análises das propriedades físicas de cada amostra para a escolha das melhores concentrações. As melhores concentrações, nesta etapa, foram consideradas como aquelas que formavam um gel com viscosidade que permitisse sua injeção em seringa comum.

Após a obtenção das concentrações adequadas (cobertas pela patente descrita anteriormente), o pó de goma gelana foi pesado em balança analítica e levado à capela de fluxo laminar para ser solubilizado em 100 mL de água deionizada estéril, com agitação constante e em temperatura ambiente (entre 20 e 25 °C). A água deionizada foi previamente esterilizada em autoclave a 120 °C por 60 min. Após a solubilização da goma gelana, a solução foi levada a agitador térmico aquecido em 90 °C e mantido em aquecimento até total dispersão do pó.

Paralelamente a esse processo, o pó do vitrocerâmico foi pesado em dois béqueres de 100 mL nas proporções estabelecidas pelo teste anterior. Ainda em cabine de fluxo laminar, a solução de goma gelana, na concentração selecionada, foi adicionada ao pó de vitrocerâmico sendo transferido, com pipeta graduada para cada béquer, nas proporções estabelecidas.

3.3 TESTE DE SOLIDIFICAÇÃO

As soluções resultantes foram destinadas ao teste de solidificação que consistiu no contato do hidrogel com solução simuladora de fluido corpóreo e soluções contendo os íons Cl^- , Na^+ , K^+ , HCO_3^- , HPO_4^{2-} e Ca^{+2} em concentrações proporcionais às encontradas nos fluidos corpóreos (POMPEU, 2013). Com uma pipeta Pasteur, 10 gotas do hidrogel foram despejadas em béqueres contendo cada um, 20 ml de cada solução e analisados visualmente e, a cada minuto, uma gota foi retirada com pinça para análise da solidificação em cada uma das soluções:

- Cl^- na concentração de 118 m.mol.L⁻¹
- Na^+ na concentração de 145 m.mol.L⁻¹
- K^+ na concentração de 5 m.mol.L⁻¹
- HCO_3^- na concentração de 30 m.mol.L⁻¹

- Ca⁺ na concentração de 20 m.mol.L⁻¹
- HPO₄⁻² na concentração de 1 m.mol.L⁻¹

3.4 CULTIVO CELULAR

As células utilizadas foram célula-tronco mesenquimais (ou estromais mesenquimais multipotentes) provenientes de medula óssea. Os aspirados de MO foram colhidos das cristas ilíacas ou das cabeças femorais de pacientes ortopédicos submetidos a próteses de quadril no hospital Cisanello, na cidade de Pisa, Itália, no ano de 2015, criopreservadas em nitrogênio líquido. As CMM foram isoladas e expandidas *in vitro* de acordo com protocolos padronizados da literatura (Haynesworth et al. 1992). Resumidamente, o aspirado, contido em tubos, foi diluído com solução salina estéril e adicionado Lymphoprep (Axis-Shield, Noruega) como um gradiente de densidade. Os tubos foram levados para centrifugação a 900 g por 25 min, a camada de células mononucleares (MNC) foi removida da interface e suspensa em meio completo (DMEM LG, 10% FCS, Invitrogen, Reino Unido), contendo 100U/ml de sulfato de gentamicina (Cambrex, B), L-Glutamina 2 mM (Cambrex, B). Esta mistura foi centrifugada a 400 g por 7 min, e foi plaqueadas com 0,2 x 10⁵ células por cm². Após cultura *in vitro* por 24 h, as células não aderentes foram descartadas. Quando as culturas atingiram cerca de 70% de confluência, as células aderentes sofreram dissociação enzimática por tripsina a 0,25% (Sigma, I) e replaqueadas a uma concentração de 5 x 10³ células por cm². Após atingirem concentração ideal, foram criopreservadas segundo protocolo de Fleming e Hubel (2006).

Amostras de CMMs de dois pacientes foram retiradas do armazenamento de nitrogênio líquido, diluídas com meio de cultura fresco (CM), composto por: aMEM, L-glutamina 2 mM, 100 UI/mL de penicilina, estreptomicina 100 Ig/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA) e soro fetal bovino selecionado premium (FBS) de 16,5% (vol%) (Atlanta Biologics, Atlanta, GA). A mistura resultante foi, então, centrifugada a 400 g por 5 min para remover o meio de cultura congelado contendo dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Em seguida, as células foram semeadas em poliestireno para cultura de tecidos, em garrafas de 75 cm² a uma concentração de 10³ células viáveis por cm² e expandidos por 1 semana em meio de cultura completo, substituído a cada 3 dias. Todos os

procedimentos foram realizados em ambiente estéril e as garrafas incubadas em incubadoras da marca Thermo Fisher sob condições padrão de cultura de células, 37 °C, 95% de umidade relativa e 5% de CO₂.

3.5 PRODUÇÃO DOS ARCABOUÇOS

Durante o cultivo celular descrito, procedeu-se com a produção do hidrogel apenas das proporções selecionadas (protegidas por patente) como previamente descrito na fabricação do biocompósito porém, dessa vez, no laboratório OTOLAB. Os componentes em pó do hidrogel foram transportados do Brasil à Itália para que a construção dos arcabouços de L2F fosse realizada no laboratório italiano para evitar contaminação durante o transporte, assim como quebra das peças. Após a obtenção do L2F, os arcabouços foram construídos em placas de 24 poços em capela de fluxo laminar por transferência do material obtido para os poços. O L2F foi transferido com espátula esterilizada até o preenchimento completo do poço, seguido de retirada de 1,5 mL com micropipeta. Esse procedimento, foi realizado para que as paredes dos poços fossem revestidas pelo L2F resultando em um cilindro oco, como mostra a figura 3.



Figura 3. Esquema representativo da fabricação dos arcabouços do L2F.

3.6 CULTIVO NOS SCAFFOLDS

As amostras de L2F passaram por esterilização por irradiação de ultravioleta (UV) durante uma noite. Uma vez esterilizados, foram colocados em placa de cultura de 24 poços, em quadruplicata para cada concentração sendo dois deles destinados para cultivo com meio de cultura normal e outros dois com cultivo recebendo meio de cultivo osteoindutor comercial (Hmsc Osteogenic Diff Bulletkit, Lonza, Basel, Switzerland), e semeados com as células recuperadas da criopreservação na 4ª passagem, e cultivadas no L2F em 5ª passagem.

Cada arcabouço recebeu uma suspensão de células a uma densidade de 2×10^4 por cm^2 e 1 mL de meio de cultura em cada poço. A cultura de células foi realizada por três semanas em uma incubadora umidificada e a 5% de CO_2 . O meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

3.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular em contato com os arcabouços, foi realizado o teste alamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O princípio deste teste está na correlação entre a redução do indicador REDOX resazurina e a atividade metabólica celular, resultante na mudança de cor de acordo com o metabolismo, sendo originalmente roxo-azulado e após a oxirredução, rosa fluorescente. Este ensaio pode ser realizado várias vezes na mesma amostra devido à sua toxicidade desprezível. Os sistemas célula/arcabouços foram colocados em placas de 24 poços e os ensaios foram realizados nos dias 2, 5, 8, 12 após semeadura celular. As amostras foram incubadas por 3 h, envoltas em papel alumínio a 37 °C com a solução de alamarBlue de acordo com instruções do fabricante, na mesma placa. Oito poços sem arcabouço e sem cultivo celular, foram preenchidos para serem utilizados como controle negativo da viabilidade.

Após a incubação, 100 μl de cada amostra foram coletados em triplicata e transferidos para uma placa de 96 poços para análise em leitor de placas (Victor3, PerkinElmer, Waltham, EUA). Os valores de absorbância de 570 nm e 600 nm foram registrados. A porcentagem de redução foi calculada

correlacionando os valores de absorvância com os coeficientes molares do corante nos comprimentos de onda selecionados, seguindo a equação fornecida pelo protocolo do fabricante.

Na placa de 24 poços contendo os arcabouços com as células, o excesso de solução do alamarBlue® foi retirado e adicionado meio de cultura fresco para continuidade do cultivo em condições normais, como descrito anteriormente. Ao final do período de cultivo, as estruturas semeadas com células foram retiradas dos poços e fixadas em formalina tamponada neutra a 4% p / v, diluída em PBS 1x (0,1M pH 7,2) (Bio Optica, Milão, Itália), durante a noite, e em 4 ° C. No dia seguinte, as amostras foram lavadas quatro vezes com PBS, uma vez a cada 15 min.

3.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS E MATRIZ MINERALIZADORA

Para avaliar a presença de células nos arcabouços após o cultivo e presença de matriz mineralizada, as peças fixadas em formalina foram analisadas com o ensaio de mineralização Osteoimage TM (LOPA1503 Lonza, Basileia, Suíça), com base na ligação específica do reagente de coloração fluorescente Osteoimage TM (em verde), à hidroxiapatita dos nódulos ósseos depositados pelas células, seguindo as instruções do fabricante. De forma geral, as peças foram incubadas em reagente de coloração por 1 h no escuro à temperatura ambiente, depois lavadas com PBS, uma vez por 5 min. As amostras foram então contrastadas com 10µg / ml de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI-Life Technologies) diluídas em PBS, uma vez por 10 min, para que fosse possível a detecção de núcleos celulares (fluorescente, em azul) e lavados uma vez em PBS. As amostras foram observadas por um microscópio de fluorescência invertido equipado com uma câmera digital (Nikon Eclipse Ti, Amsterdã, Holanda).

3.9 DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS NOS ARCABOUÇOS

Foi realizado, também, o teste de coloração com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Para observação da distribuição celular nos arcabouços. As amostras foram incubadas na solução por 5 min, seguida de lavagem em água da torneira por 5 min para revelar a reação. Os núcleos das células aderidas ao L2F se apresentam após o processo, coradas com hematoxilina em azul - violeta. As amostras foram observadas por um microscópio de fluorescência invertido equipado com uma câmera digital (Nikon Eclipse Ti, Amsterdã, Holanda).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias das porcentagens de redução do corante alamarBlue® significando a viabilidade celular em cada amostra, foram calculadas e analisadas no programa PAST. Os dados foram analisados por análise fatorial de variância. As diferenças entre os grupos foram determinadas usando a análise de variância de uma via (ANOVA) com um nível de significância definido em $p \leq 0,05$ seguido de teste Tuckey. Diferenças com probabilidade de $p < 0,05$ foram consideradas significantes.

3.11 ANÁLISE DE APLICAÇÃO *IN SITU* DO HIDROGEL

Um estudo piloto de aplicação do L2F por meio de extrusão manual por seringas *in situ* foi realizado no hospital Cisanello, utilizando osso temporal humano (comercializado pela United Tissue Network para fins de pesquisa e educação), previamente desgastado, simulando perfuração. O teste foi realizado por meio do estabelecimento da temperatura do L2F para aplicação em cirurgias.

O estudo se deu pela fabricação do L2F nas concentrações de 1% e 2% de vitrocerâmico e colocados em seringas contendo agulhas de 0,4 e 0,55 mm. As seringas foram tampadas e mantidas em banho-maria na temperatura de 25 °C apoiadas em estantes até o momento da aplicação no osso temporal. A aplicação do L2F foi realizado por um cirurgião otorrinolaringologista, seguida de uma entrevista aberta sobre as percepções em um recorte qualitativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FABRICAÇÃO DOS BIOCOMPÓSITOS

É necessário o desenvolvimento de novos biomateriais seguros aplicáveis à medicina regenerativa para suprir as lacunas ainda existentes, ou para aprimorar tratamentos na rotina clínica. Para tanto, a principal característica dos materiais desenvolvidos pela bioengenharia é a biocompatibilidade. Aliado a esse desafio, o presente estudo teve, por finalidade, o desenvolvimento de um material com caráter inovador, que atenda a esse mercado. O interesse pela produção de um biocompósito surgiu pela percepção dessa necessidade e a partir de então, iniciou-se um estudo embasado em relatos da literatura dos biomateriais potencialmente aplicáveis à bioengenharia de tecidos, sendo levantadas diversas hipóteses até a escolha dos dois biomateriais componentes do biocompósito, objeto do presente estudo.

A escolha resultante do levantamento bibliográfico, foi a goma gelana por apresentar características satisfatórias tanto para aplicação *in situ*, quanto na forma de biotinta por sua apresentação em fase gelatinosa. A hipótese da união com um vitrocerâmico biocompatível foi considerada com a intenção de se aprimorar as características físicas e mecânicas do material resultante, intenção essa, condizente com as relatadas por vários autores na formulação de novos biocompósitos (PIRES et al., 2015). A união da goma gelana com o vitrocerâmico gerou um produto de caráter inovador, o L2F, permitindo o registro de patente de invenção junto ao INPI (BR 10 2019 014592 7).

O desenvolvimento do L2F nas proporções de 5% GG:1% vitrocerâmico e 5% GG:2% vitrocerâmico, foram resultado de vários testes para a obtenção das características físicas com melhor desempenho (gelificação e facilidade de injeção). A primeira análise foi referente ao produto da adição das mesmas proporções de GG de alto e baixo acil, em água deionizada, sendo observada a formação de hidrogéis distintos, como esperado por análise prévia da literatura (VIEIRA et al., 2019). Os hidrogéis formados com a GG de alto acil eram mais borrachosos, quando comparados com os hidrogéis de GG de baixo acil.

Em relação aos produtos nas diferentes concentrações de GG, tanto os de alto quanto de baixo acil, obtidos com a solução de 5 g de GG em 100 mL de

água deionizada, se mantiveram em forma de gel estável na temperatura ambiente. Os hidrogéis com concentração de GG maior que 5% em massa, de forma geral, se apresentaram espessos e com geleificação espontânea, em ambas as formas químicas, como observado na figura 4. Esse comportamento é inadequado para processos de injeção do material em temperaturas abaixo de 37 °C, importantes para a bioimpressão.

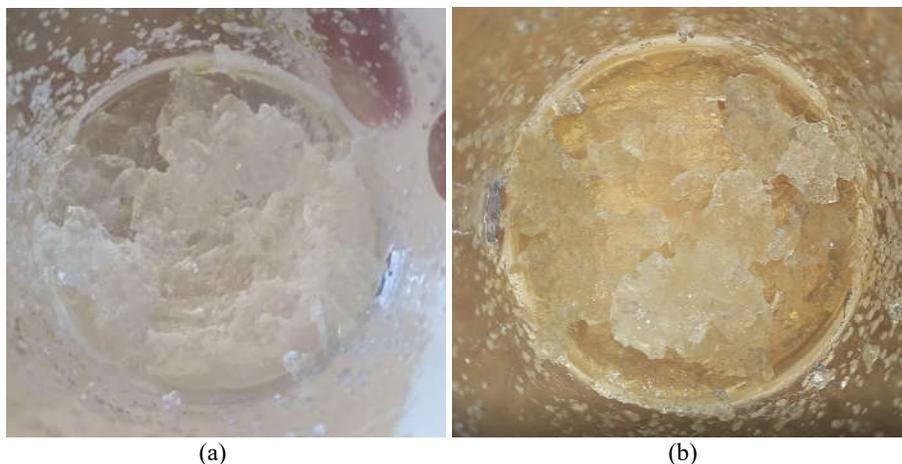


Figura 4. Geleificação de hidrogéis em proporções de 5,5% de goma gelana de baixo (a) e alto acil (b).

Devido à esses resultados, a concentração de GG selecionada foi de 5% em massa, garantindo a capacidade de injeção em temperaturas amenas pensando na aplicação em conjunto com células, com o intuito de mantê-las viáveis. A partir desses resultados, portanto, deu-se continuidade aos testes e o estudo da porcentagem de vitrocerâmico foi analisada em adição de 1% a 10% nas soluções de GG 5%.

Os biocompósitos gerados que apresentaram características satisfatórias foram os resultantes das seguintes combinações, em porcentagens em massa:

- GG de baixo acil 5% + vitrocerâmico 1% (Figura 5a)
- GG de baixo acil 5% + vitrocerâmico 2% (Figura 5b)

As concentrações a partir de 3% em combinação com a solução de GG de baixo acil, resultaram em hidrogéis quebradiços, rígidos e com formação de precipitados visíveis, sendo, portanto, descartados. As proporções de 1% e 2% resultaram em soluções homogêneas que mantiveram o aspecto gelatinoso. O hidrogel com 1% de vitrocerâmico apresentou aspecto transparente e viscosidade levemente aumentada (visivelmente observada), quando

comparado ao produto da GG 5%. O hidrogel com 2% de vitrocerâmico resultou em hidrogel esbranquiçado com viscosidade aumentada, mas não foi observada formação de precipitados, mantendo a homogeneidade da solução. As soluções de GG de alto acil 5% apresentaram precipitação do vitrocerâmico em todas as concentrações, possivelmente pelo baixo potencial de formação de ligação química, como relatado na literatura (VIEIRA et al., 2019) e, por esse motivo, foram eliminados dos testes seguintes. A Figura 5 mostra a aparência do L2F quando o vitrocerâmico é incorporado em 1% e em 2% em massa.

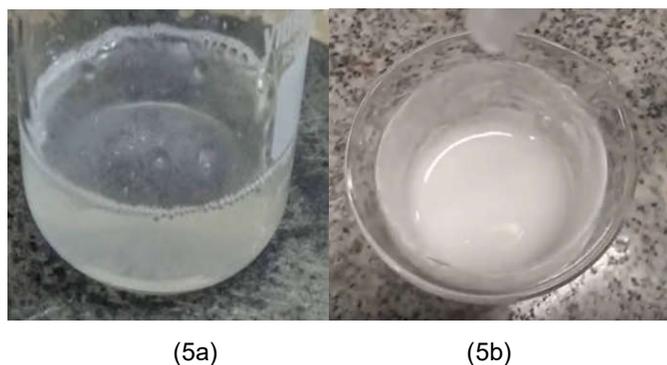


Figura 5. Vitrocerâmico incorporados à GG 5%, na proporção de 1% em massa (a), e 2% em massa (b).

4.2 TESTE DE SOLIDIFICAÇÃO

O teste de solidificação foi realizado para ambas as amostras em soluções iônicas conforme descritas por Pompeu et al. 2013. O objetivo deste teste foi avaliar o comportamento do L2F simulando o contato com os fluidos corpóreos, assim como em contato com os íons separadamente. Os resultados observados foram o enrijecimento das gotas do L2F em todas as soluções. No entanto, características distintas entre eles foram constatadas.

Em contato com as soluções de Cl^- , Na^+ , K^+ , HCO_3^- e HPO_4^{2-} , o hidrogel apresentou enrijecimento moderado, formando arcabouços semi-rígidos com estrutura delimitada e ausência de dispersão no líquido. No entanto, a fase se manteve entre sólido e gel, evidenciando o conceito trazido em 1991 por Deasy, da GG apresentar pouca tixotropia. Dessa forma, é possível observar que a adição do vitrocerâmico nas concentrações de 1 e 2% não alteram essa característica da GG quando colocados em interação com essas soluções.

Em contrapartida, gotas do L2F em contato com as soluções de cálcio e com o fluido corpóreo simulado, apresentaram solidificação instantânea e mais significativa se comparado ao resultado das demais soluções, produzindo arcabouços fisicamente semelhantes à cartilagem natural, com aspecto semi-rígido e homogêneo. Esse resultado é condizente com a literatura que reporta a gelificação da GG mais intensa quando ligada à cátions monovalentes (STEVENS, 2016). Pode-se observar que o hidrogel de GG pode apresentar enrijecimento sem atingir o estado sólido. No entanto, o resultado encontrado pela mistura do vitrocerâmico com a GG em soluções contendo cálcio, mostrou mudança dessa característica, sendo possível constatar que o objetivo primário da formulação de um biocompósito para aprimorar as características da matriz principal (GG) foi atingido. Dessa forma, a adição de 1% de vitrocerâmico, se mostra suficiente para gerar o aumento da tixotropia no biocompósito formulado, como observado na figura 6.

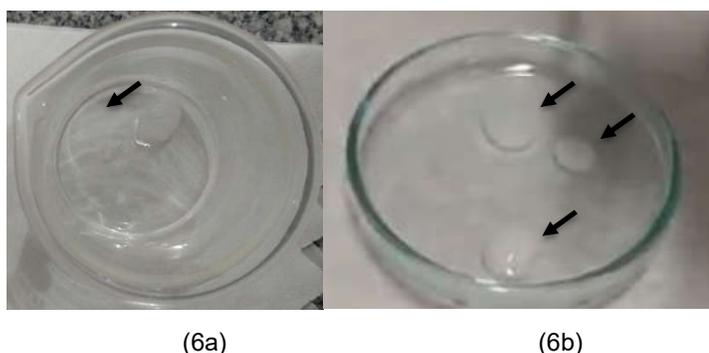


Figura 6. Teste de solidificação do L2F em solução de cálcio: 1% vitrocerâmico (a), e 2% vitrocerâmico (b).

As características observadas pelos arcabouços formados no teste de solidificação, são capazes de dar embasamento para futuros modelos para bioimpressão por extrusão úmida. A utilização de diferentes soluções como banho de coagulação pode gerar diferentes produtos biofabricados à base do mesmo hidrogel, com propriedades distintas, apenas pelo contato com os íons componentes da solução.

Os resultados do teste realizado sugerem que a bioimpressão do L2F nas concentrações de 1 e 2% de vitrocerâmico, é capaz de gerar produtos destinados à engenharia de tecido ósseo e cartilaginoso, quando extrudados em banho de cálcio. No entanto, a hipótese de aplicação especificamente à esses tecidos

pode ser ampliada pela possibilidade de bioimpressão em conjunto com soluções de coagulação de Cl^- , Na^+ e K^+ para obtenção de fibras e tecidos mais complexos, como os que requerem crescimento celular direcional, principalmente nervos e músculos, como sugerido também por Stevens (STEVENS, 2016).

4.3 CULTIVO CELULAR NOS ARCABOUÇOS

Os testes relacionados à avaliação da biocompatibilidade do biocompósito hidrogel, foram realizados no hospital Cisanello localizado na cidade de Pisa, Itália, em uma parceria com o laboratório de pesquisa com foco em otorrinolaringologia (OTOLAB) do hospital Pisano. O OTOLAB possui um banco de células-tronco provenientes de pacientes que realizam cirurgia ortopédica, informados sobre a coleta de medula para isolamento de células-tronco estromais multipotentes para fins científicos. A liberação para utilização das células tronco para o presente trabalho foi deferida mediante a apresentação do projeto ao corpo avaliador do OTOLAB sob supervisão do comitê de ética do hospital Cisanello. No entanto, a documentação é de porte exclusivo do hospital.

O cultivo celular foi iniciado a partir do descongelamento de células de dois pacientes de idades não reveladas, conforme protocolo padrão de descongelamento e plaqueadas para expansão celular durante 7 dias. Esse período não foi suficiente para que as células atingissem confluência, mas foi observada a multiplicação celular, e as células sofreram dissociação enzimática para serem transferidas para os arcabouços. Nessa etapa, as células foram contabilizadas em placa de Newbauer e semeadas nos arcabouços, na proporção previamente estabelecida pela equipe técnica do laboratório de 2×10^4 , com intuito de avaliar a aderência e a viabilidade celular em contato com o L2F. Os resultados obtidos nessa etapa foram apenas protocolares, sendo uma fase preliminar de preparação dos testes seguintes, sendo essencial a multiplicação celular prévia e a preparação dos conjuntos que formaram o objeto de estudo para análise da viabilidade celular.

4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, ADERÊNCIA E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

A análise do biocompósito quanto ao potencial de biocompatibilidade se deu pela avaliação de atividade metabólica das células-tronco em cultivo no biomaterial. O teste utilizado foi o alamar blue que tem como principal vantagem, permitir a análise da atividade celular na mesma amostra, durante todo o período de cultivo. Dessa forma, os arcabouços com as células foram monitorados durante 14 dias (12 dias para os testes de viabilidade, continuando o cultivo até o 14º dia para prosseguir com os testes histológicos), com meio normal de cultura e com meio osteoindutor. O intuito da utilização do meio comercial osteoindutor, foi a formação de controles positivos, visto que diante dos dados encontrados na literatura, o material desenvolvido apresenta, dentre todas as induções possíveis, a maior potencialidade teórica de indução de diferenciação das células-tronco estromais multipotentes em osteoblastos.

Os resultados obtidos são apresentados na Figura 7 que demonstra a atividade metabólica celular por detecção da porcentagem de redução do corante de alamar blue em comparação com o controle negativo. Dessa forma, foram obtidos quatro valores referentes à média das porcentagens calculadas para cada dia de análise das amostras do L2F nas diferentes proporções estudadas.

A produção do arcabouço com o revestimento das paredes dos poços, evitou a adesão celular ao plástico (poliestireno) e, por consequência, a leitura da viabilidade de células não aderidas ao L2F. Dessa forma, a análise sugere, primeiramente, uma adesão celular aos arcabouços, evidenciada pela detecção de viabilidade celular nos poços. Essa hipótese pode ser considerada pela retirada das células não aderidas juntamente com o meio de cultivo, antes da adição do corante de alamarBlue, restando apenas as células aderidas à superfície do L2F para a avaliação da atividade metabólica.

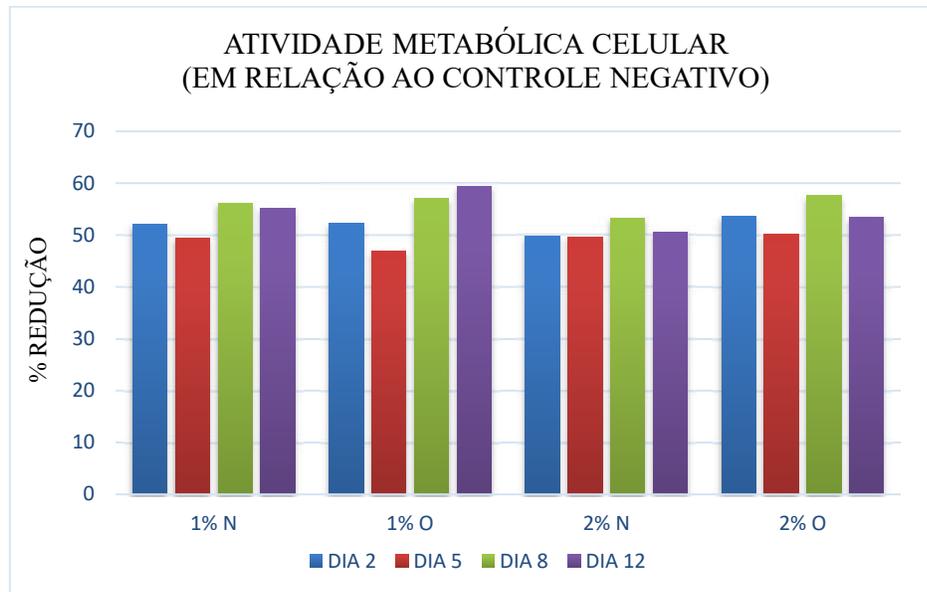


Figura 7. Porcentagens de redução da reazurina representando a atividade metabólica celular nas amostras com proporção de 1% e 2% em massa de vitrocerâmico em cultivo no meio normal (N) e osteogênico (O) nos dias 2, 5, 8 e 12 de cultivo.

A observação isolada dos arcações do L2F com 5% de GG e 1% de vitrocerâmico com células em meio de cultura completo normal, demonstrou viabilidade celular de 52,1% no segundo dia de cultivo, com decaimento de 2,6% para o 5º dia. Essa diminuição da viabilidade pode ter sido causada por um período de adaptação das células, em decorrência da mudança de ambiente do cultivo. Anteriormente, as células estavam aderidas ao poliestireno das garrafas de cultura e, posteriormente ao L2F. Dessa forma, nas primeiras 48 h de cultivo, as células podem ter se apresentado viáveis e entrado em senescência após esse período, se desprendendo do L2F e sendo descartadas junto com o meio de cultura. Essa diminuição pode ainda ter sido consequência da manipulação das amostras necessária para a realização do teste, ocasionando retirada de células aderidas aos arcações e, conseqüentemente, diminuindo o nível de reação de redução da reazurina. No entanto, a viabilidade celular aumentou em 6,7% entre o 5º e 8º dias e superou a viabilidade celular detectada na primeira leitura (48h) em 4,1%. Esse aumento da viabilidade sugere que o período de cultivo proporcionou o aumento do número de células aderidas, portanto viáveis. A compatibilidade da interação entre as células cultivadas e o L2F pode também ser sugerida por esse padrão apresentado (OLIVEIRA, 2019).

Na sequência, a análise da viabilidade referente ao 12º dia, apresentou uma queda de 1% em relação à detectada no 8º dia. Essa queda foi, possivelmente, ocasionada por confluência no arcabouço, gerando falta de espaço para o crescimento celular, estimulando a diminuição dos níveis metabólicos. Pode, ainda, ser considerada novamente a hipótese de remoção acidental de células durante o procedimento. Esse mesmo padrão de apresentação da viabilidade celular pôde ser observado em trabalhos como de Puertas-Bartolomé em 2019 e Moscato em 2015.

O arcabouço com a mesma proporção dos biomateriais cultivado com meio osteoindutor, apresentou um padrão de viabilidade celular similar ao cultivado com meio normal, com 52,3% de viabilidade detectada nas primeiras 48 h de cultivo, e queda da viabilidade do 2º para o 5º dia de 5,4%. No entanto, apresentou aumento registrado de 10% entre o 5º e o 8º dias e, dentre todos os grupos analisados, foi o único que apresentou aumento da viabilidade de 2,7%, no 12º dia de cultivo, resultando em 7,1% de redução da reazurina em relação ao primeiro dia analisado. Essa resposta da atividade metabólica celular em contato com os arcabouços demonstra uma afinidade na interação entre o L2F e as células, sugerindo a biocompatibilidade do material.

O cultivo celular em meio osteogênico demonstrou melhor desempenho se comparado ao meio normal de cultura. Esse resultado é comum na prática laboratorial como relatado por Huang et al. em estudo realizado em 2007 (apud LOBO et al., 2015). No estudo realizado, foi evidenciada uma proliferação celular significativa no período de 11 dias pós semeadura, anterior ao início da diferenciação celular que ocorreu no 14º dia de cultivo, indicando tendência de proliferação potencializada pelo meio osteoindutor, no período anterior à diferenciação celular (LOBO et al., 2015)

O resultado obtido no arcabouço com 1% de vitrocerâmico, apresenta a mesma perspectiva, considerando que a viabilidade celular é influenciada pela concentração de células na amostra, de maneira proporcional. Esse resultado, indica capacidade aumentada da adesão celular ao arcabouço que, por consequência, apresenta maior proliferação celular resultando em maior detecção da viabilidade pelo teste alamarBlue, (LORO et al, 2009). Dessa forma, pode-se considerar que o meio indutor osteogênico acelerou e favoreceu a adesão celular ao arcabouço e a proliferação antes que a diferenciação seja

evidenciada, mostrando potencial de utilização conjunta aos biomateriais na engenharia de tecidos por essas características demonstradas.

As amostras construídas por células em contato com o arcabouço 5% GG e 2% vitrocerâmico cultivadas em meio convencional, proporcionou um padrão de viabilidade mais estável, em comparação aos demais. Pode ser observada uma constância nas médias obtidas no 2º e 5º dias de cultivo sendo 49,8% e 49,6%, respectivamente. A viabilidade apresentada no 2º dia de cultivo foi a menor dentre as amostras analisadas, podendo sugerir taxa de adesão celular ao arcabouço menor do que as demais. No entanto, a viabilidade não sofreu variação no 5º dia de análise como observado nas demais amostras, indicando uma estabilidade na atividade metabólica celular, constância na concentração de células aderidas nesse período, e sugerindo baixo índice de proliferação celular.

No 8º dia de cultivo, foi observado aumento da viabilidade celular, e possivelmente, maior taxa proliferativa, demonstrando uma adaptação celular ao ambiente de cultivo e permitindo que novas células se aderissem ao arcabouço. Porém, mesmo não havendo queda na viabilidade detectada no 5º dia, o aumento detectado foi abaixo da média apresentada pelos outros arcabouços, sendo de 3,6% no mesmo dia de análise. Esse resultado expressa maior dificuldade das células para se manterem viáveis aderidas ao L2F em meio de cultivo tradicional. No último dia de leitura da absorbância, as células apresentaram-se com menor viabilidade que a anterior, sendo detectado um decaimento da porcentagem de redução em 2,5, o que sugere elevação da taxa de senescência celular, resultado que corrobora com os resultados iniciais, evidenciando a mais fraca interação entre célula e o arcabouço, nessas condições de cultivo.

A amostra cultivada com meio indutor osteogênico na proporção de 2% de vitrocerâmico obteve resultados distintos, apresentando maior detecção de atividade metabólica celular (53,6%) do que o cultivado em meio convencional. Essa amostra apresentou, como as duas de concentração 1% vitrocerâmico, a diminuição percentual no 5º dia equivalente à 3,5% inferior à primeira detecção. No 8º dia, foi registrado o aumento da atividade metabólica em 7,3% com posterior queda de 4,1%. Esse padrão de apresentação das viabilidades indicam a elevação do potencial de adesão celular proporcionado pelo meio osteoindutor,

assim como observado na amostra 1% vitrocerâmico, evidenciando maior desempenho celular em ambas as amostras.

O aumento da viabilidade registrado no 8º dia, mostra ter sido consequência da maior adesão induzida pelo meio de cultura. No entanto, a queda acentuada entre o 8º e o 12º dias e pós semeadura, indica diminuição da taxa de proliferação e da atividade metabólica celular. O aumento da viabilidade no 8º dia relacionada à proliferação celular foi, possivelmente, responsável pela obtenção da confluência da superfície do arcabouço causando limitação do espaço e impedindo a constância do crescimento celular. Além da confluência, a ausência da detecção de proliferação no último dia de análise, demonstra a possibilidade do material não ter favorecido a migração celular ao seu interior, devido à estrutura menos maleável que a do arcabouço 1% vitrocerâmico, mesmo sendo estimuladas pelo meio osteoindutor, limitando o crescimento apenas à superfície.

Ao serem analisadas as quatro amostras, foi observada capacidade interativa positiva, com adesão celular e proliferação, em todas as condições. Os picos de viabilidade foram registrados principalmente no 2º e 8º dias de cultivo, demonstrando atividade metabólica, primeiramente das células aderidas ao arcabouço nas primeiras horas após a semeadura e, posteriormente, pelo aumento da viabilidade no 8º dia, superior ao registrado inicialmente em todos os casos analisados.

Foi verificado aumento da viabilidade entre a atividade metabólica inicial de 4,1% no arcabouço 1% em meio normal, 4,8% no 1% vitrocerâmico em meio osteoindutor, 3,4% em 2% vitrocerâmico normal, e 3,8% no arcabouço 2% em meio osteogênico. Esses resultados evidenciam maior afinidade interativa nos arcabouços com concentração de 1% vitrocerâmico, potencializada pelo meio osteogênico em ambos os pontos de pico, tanto na adesão quanto no potencial proliferativo demonstrado pela elevação da viabilidade no 8º dia. Isso resultou no maior índice de elevação em comparação à viabilidade inicial e, conseqüentemente, no melhor desempenho entre todos os arcabouços.

Ao serem comparados os níveis metabólicos apresentados no 12º dia, o arcabouço 1% em meio osteogênico foi o único que apresentou aumento da viabilidade (2,3%) em relação ao 8º dia. Esse comportamento demonstra a possibilidade de migração celular para o interior do L2F, permitindo maior

proliferação por aumento da superfície de contato, resultando em maior adesão e proporcional aumento de atividade metabólica. Portanto, o meio osteogênico favorece, além das atividades reportadas na literatura, uma possível propriedade de carreamento das células para o interior dos hidrogéis, e promove adesão eficiente nesse local. Essa possibilidade pode ser considerada pelo L2F 1% apresentar estrutura com maior maleabilidade, favorecendo a migração celular.

Em estudo do comportamento migratório em arcabouços contendo hidroxiapatita, foi demonstrado maior nível de migração celular para o interior do hidrogel em amostras com menor concentração da hidroxiapatita que possui as mesmas características osteoindutoras e osteocondutoras do vitrocerâmico utilizado no presente trabalho. Portanto, é possível considerar que o aumento da concentração do biocerâmico no hidrogel é inversamente proporcional ao favorecimento da atividade migratória, pela diminuição da maleabilidade (BACKDAHL et al, 2006). Esse aumento da concentração de biocerâmico é relacionado, no mesmo trabalho, à elevação da capacidade de adesão celular. No entanto, o aumento de 1% na concentração do vitrocerâmico ao hidrogel (2%), não foi suficiente para elevar o potencial de adesão em meio de cultivo convencional, sendo demonstrada maior capacidade de adesão e viabilidade no arcabouço de menor concentração do vitrocerâmico, como já mencionado.

Ao ser analisada a diferença entre o estado da viabilidade inicial e final (2^o e 12^o dias) de todas as amostras, observou-se resultado positivo nos arcabouços contendo 1% de vitrocerâmico em ambas as condições de cultivo e, na amostra 2%, com cultivo em meio normal. Foi observada a elevação da viabilidade em 3,1% no arcabouço 1% em meio normal, 7% em cultivo com meio osteogênico e 0,8% no arcabouço 2% em meio normal. A amostra contendo o arcabouço 2% em cultivo no meio osteogênico, apresentou uma sutil queda da viabilidade entre o início do cultivo e o final com decréscimo de 0,3%. Esse comportamento indica que o meio osteogênico proporcionou a adesão celular com eficiência nas primeiras horas de cultivo. No entanto, é possível que as células aderidas inicialmente tenham entrado em senescência no final do período de cultivo, em concomitância à limitação da proliferação, como já mencionado.

4.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE CÉLULAS E MATRIZ MINERALIZADORA

Ao completar 14 dias em cultivo, os arcabouços contendo as células passaram pelo teste com reagente de coloração DAPI e Osteoimage, cujos resultados são apresentados nas imagens observadas por microscópio de fluorescência invertido com câmera digital (Nikon Eclipse Ti, Amsterdã, Holanda) em escala de 100 μ m (figura 8). A amostra correspondente à coloração com DAPI do cultivo celular em 1% de vitrocerâmico em meio comum é apresentada na figura 8A e reforça as suposições consideradas em relação ao elevado índice de adesão celular, a proliferação e a confluência. Portanto, o teste confirmou a presença de células na superfície do arcabouço, no final do período de cultivo, com apresentação da adesão de forma homogênea e em toda a sua superfície.

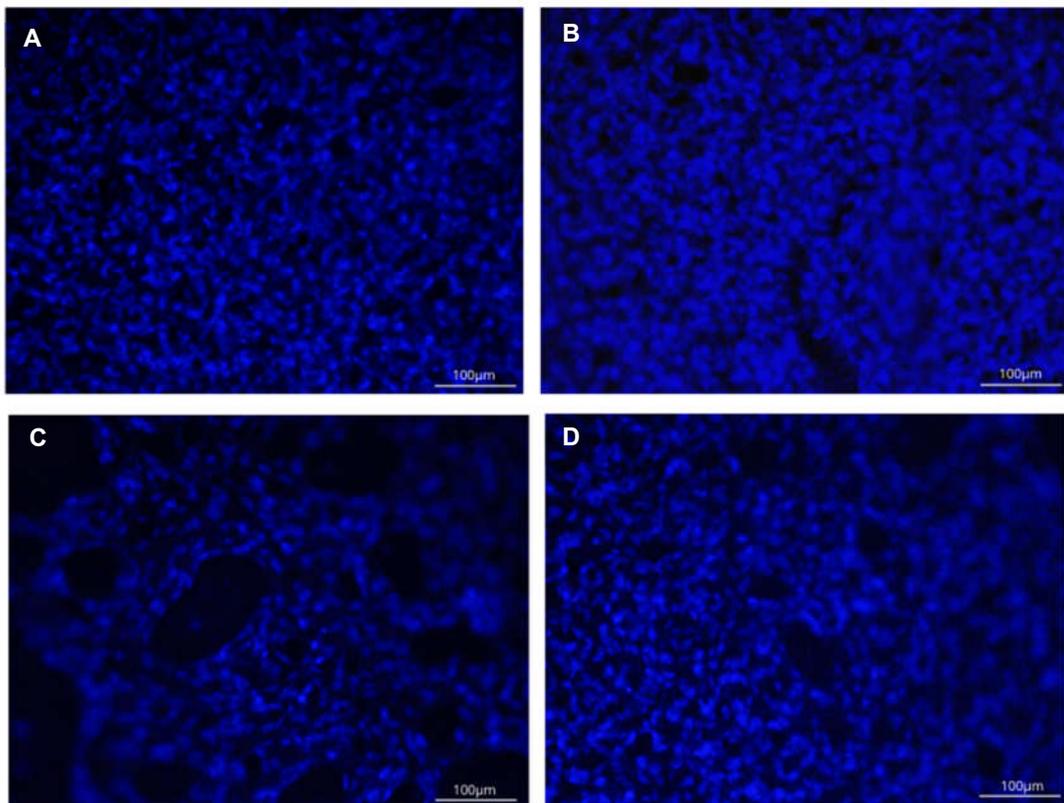


Figura 8. Teste de coloração DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol para visualização dos núcleos das células aderidas às amostras: (A) 1% vitrocerâmico em cultivo com meio convencional, (B) 1% vitrocerâmico em cultivo com meio osteoindutor, (C) 2% vitrocerâmico em cultivo com meio convencional, (D) 2% vitrocerâmico em cultivo com meio osteoindutor.

O arcabouço com proporção de 1% vitrocerâmico cultivado em meio osteogênico, demonstrou como esperado pelo desempenho apresentado durante o cultivo, a maior confluência entre as amostras, confirmando a presença de células na amostra (figura 8B). Ainda é possível perceber, sobreposições de núcleos por toda superfície, sugerindo a migração celular para o interior do arcabouço, como anteriormente suposto, por ser o único que apresentou aumento da viabilidade no 12º dia de cultivo pelo teste alamarBlue. Em comparação ao mesmo arcabouço com cultivo em meio comum, a tendência de maior adesão e proliferação celular induzido pelo meio osteoindutor pode ser comprovado. No entanto, as células cultivadas em meio comum, demonstraram afinidade de interação natural com o L2F, com níveis de viabilidade similares. Dessa forma, pode-se sugerir biocompatibilidade do L2F com 5% de GG e 1% de vitrocerâmico em ambas as formas de cultivo.

A amostra formada por 2% vitrocerâmico com células cultivadas em meio convencional (figura 8C) mostrou a presença de células aderidas em sua superfície. No entanto, foi observada a presença de vazios com ausência de células aderidas sendo, portanto, a superfície que apresentou menor concentração celular. Esse resultado é condizente com o padrão de comportamento demonstrado pela detecção da viabilidade, sendo o de menor interação célula- arcabouço.

O arcabouço com mesma composição, mas cultivado em meio osteogênico, demonstrou maior interação com a superfície do L2F, apresentando maior número de células aderidas (figura 8d). É possível observar confluência na maior parte do arcabouço. No entanto, percebe-se também a presença de vazios. Essas observações corroboram com o resultado do 12º dia de cultivo que demonstrou diminuição da viabilidade, possivelmente ocasionada pela senescência celular, e diminuição da proliferação como mencionado na discussão sobre o teste alamarBlue.

Esperava-se que ocorresse a indução de diferenciação das células estromais em osteoblastos pela interação entre o L2F e as células, devido aos relatos de estudos prévios, mostrando a capacidade osteoindutora do vitrocerâmico usado no presente trabalho. Por isso, as amostras foram avaliadas por meio da reação de coloração do Osteoimage, que ligado à nódulos ósseos apresenta coloração verde fluorescente.

Foi observado que o corante Osteoimage reagiu com os fragmentos do vitrocerâmico presente no L2F, reação essa prevista pela interação do corante com os fosfatos de cálcio componentes do vitrocerâmico. Portanto, foi possível identificar, em todas as amostras, elementos corados do vitrocerâmico dispersos na goma gelana. Os resultados obtidos estão representados na figura 9, pelas imagens observadas por microscópio de fluorescência invertido com uma câmera digital (Nikon Eclipse Ti, Amsterdã, Holanda).

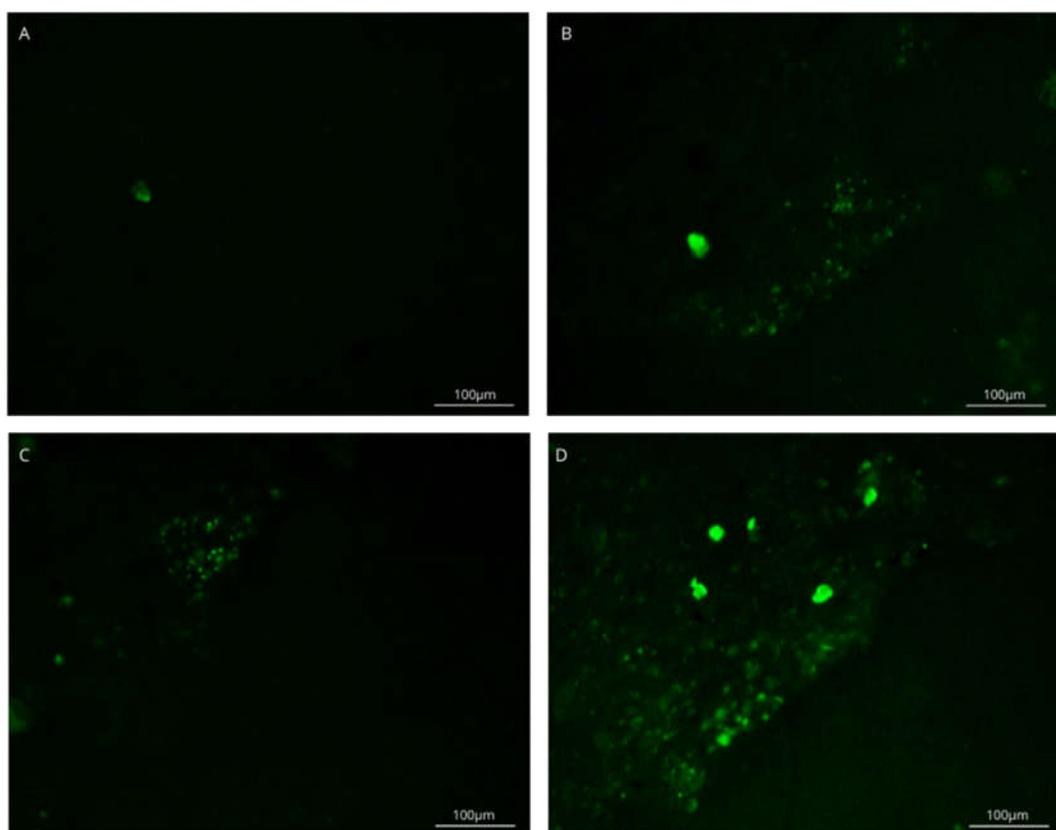


Figura 9. Ensaio de mineralização Osteoimage TM (LOPA1503 Lonza, Basileia, Suíça), com ligação específica aos fosfatos de cálcio dos nódulos ósseos depositados pelas células na coloração verde fluorescente. (A) 1% vitrocerâmico em cultivo com meio convencional, (B) 1% vitrocerâmico em cultivo com meio osteoindutor, (C) 2% vitrocerâmico em cultivo com meio convencional, (D) 2% vitrocerâmico em cultivo com meio osteoindutor.

Para avaliar o potencial de osteoindução do hidrogel contendo 1 e 2% de vitrocerâmico, foram utilizados os controles positivos com arcações de ambas as concentrações, cultivados em meio osteoindutor simultaneamente aos cultivados com meio convencional (mesmas amostras utilizadas para o teste alamarBlue e DAPI) para comparação. Os controles estão apresentados nas imagens 6B e 6D, 1% vitrocerâmico e 2% vitrocerâmico, respectivamente. É

possível observar que houve deposição de fosfatos de cálcio pelas células, demonstrando o potencial de osteoindução do meio de cultivo e sugerindo diferenciação de celular em osteoblastos.

No entanto, a indução é percebida com intensidades distintas entre as amostras, sendo mais evidente nas células cultivadas em contato com os arcabouços com proporção 2% de vitrocerâmico enquanto que, na amostra contendo 1%, é presente a osteoindução menos expressiva até o 14^o dia. A eficácia distinta da diferenciação entre as amostras está, provavelmente, associada à composição e a estrutura física dos materiais analisados. É possível que a estrutura mais rígida da amostra com 2% de vitrocerâmico tenha favorecido, como já mencionado, o crescimento superficial das células, deixando-as expostas à atividade de osteoindução do meio de forma mais homogênea.

Ao ser analisada a amostra com 2% vitrocerâmico em cultivo convencional, é possível perceber a deposição de fosfatos de cálcio em um ponto específico do L2F, sendo sugerida indução de diferenciação celular em osteoblastos, proporcionada pelo arcabouço. Essa tendência pode estar associada à potencialização da atividade do meio osteogênico na amostra cultivada em meio indutor, o que resultou na maior produção e deposição de fosfatos de cálcio, evidenciada pelo maior índice de coloração pelo Osteoimage.

Em comparação com as amostras contendo 1% vitrocerâmico, quando cultivada em meio osteoindutor, percebe-se osteoindução menos evidente pela menor deposição de fosfatos de cálcio. Já a amostra cultivada em meio convencional, não mostrou evidências de osteoindução, não sendo visível deposição de fosfatos de cálcio em nenhuma porção do L2F. Esses resultados mostram que a atividade de osteoindução do meio utilizado na primeira amostra analisada, pode ter sofrido influência negativa em contato com o L2F. Pelo fato do L2F a 1% vitrocerâmico ser mais maleável, a penetração do meio no interior do biocompósito, como já sugerida anteriormente, pode ter ocasionado sua associação ao gel, tornando-o mais disperso e diluído e gerando, por consequência, diminuição do potencial osteoindutor.

Em relação ao cultivo em meio convencional da amostra contendo essa proporção de vitrocerâmico, é possível observar a coloração de um fragmento do biocerâmico pelo Osteoimage, no entanto, o potencial osteoindutor na

proporção 1%, não pôde ser observada. Essa resposta sugere que a concentração descrita é insuficiente para proporcionar ao L2F, a propriedade osteoindutora.

4.5 DISTRIBUIÇÃO CELULAR NOS ARCABOUÇOS

A desidratação em etanol não causou variações de volume em relação à desidratação ao ar seco, mas a alta densidade das amostras de L2F não permitiu boa incorporação da parafina, o que impediu os cortes das seções dos arcabouços para análise. Dessa forma, o teste proposto não foi adequado para essas amostras. Uma alternativa que se propõe para solucionar essa limitação, é a produção de amostras em forma de esponja de hidrogel que permita a penetração da parafina e conclusão do teste.

4.6 APLICAÇÃO POR MEIO INJETÁVEL

A viscosidade conseguida com o L2F permitiu a sua aplicação por injeção em seringa de insulina (1 mL). Foram injetadas amostras do L2F, em temperatura ambiente, sobre um osso temporal contendo perfurações como as frequentemente encontradas na prática cirurgica da especialidade de otorrinolaringologia. A injeção foi realizada com facilidade e, ambas as concentrações, mostram a mesma aplicabilidade por via injetável, como mostra a figura 10.

No entanto, a proporção de 2% vitrocerâmico, se mostrou mais moldável por apresentar maior consistência após aplicação. Ambas as amostras demonstraram fixação ao tecido circundante e solidificação (cura) instantânea, depois de irrigadas com soro fisiológico. Essa cura é esperada, pois o soro fisiológico possui íons sódio que induzem ligações cruzadas na goma gelana, endurecendo-a.

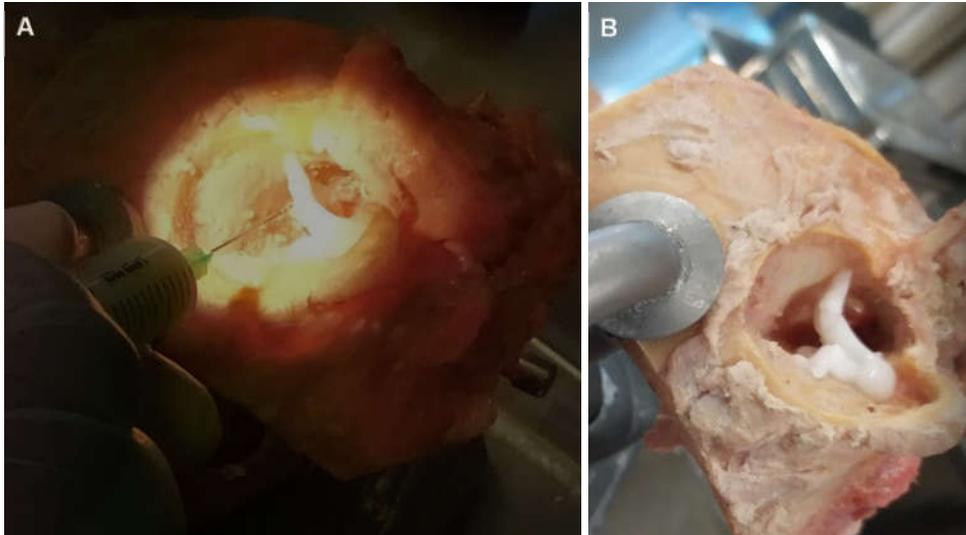


Figura 10. Reconstrução óssea de estrutura trabecular em uma amostra de osso temporal. (A) processo de injeção do L2F em forma de gel para a reconstrução do mastoide, (B) L2F solidificado após irrigação com soro fisiológico (seta).

Em recorte qualitativo, apresenta-se a opinião, traduzida nos mesmos termos (Anexo 1), do Doutor Glauco Cristofaro, residente da especialidade de otorrinolaringologia no hospital Cisanello, sobre o teste de injeção do L2F em perfuração do osso temporal mostrada na figura 10.

“Florença 12.10.2019

O biomaterial brasileiro é uma goma cerâmica sensível ao calor e achei muito útil e versátil na reconstrução óssea em uma amostra de osso temporal. É dúctil e maleável. Pode ser modelado com uma haste e, quando injetado através de uma agulha, assume e mantém uma forma cilíndrica de tamanhos diferentes, de acordo com a agulha utilizada. Também possui propriedades adesivas que permitem moldagem tri-dimesional de estruturas. Particularmente, modelado com uma lança, provou ser útil para selar lacunas acidentalmente abertas durante a dissecação aguda dos tégmen timpânico e seio sigmóide. Injetado com uma seringa, produz cilindros que me permitiram facilmente reconstruir a parede posterior do canal de maneira progressiva, uma sobre a outra, de medial para lateral. Finalmente, injetado com uma pequena agulha (20G +), permite a produção de uma estrutura trabecular semelhante à da mastoide ingênua.

Do ponto de vista cirúrgico, esse biomaterial é muito adequado para a reconstrução óssea em otologia e, extrapolando a partir da experiência que acabei de relatar, provavelmente também a cirurgia rinolaringolocial.

Dr. Glauco Cristofaro”.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada para avaliar a diferença da viabilidade celular apresentada em contato com as amostras de L2F com diferentes proporções de vitrocerâmico e meios de cultivo. O valor de p na análise ANOVA, foi maior que 0,05 ($p = 0,097$), mostrando não haver diferença significativa entre as médias da viabilidade celular nas diferentes amostras estudadas. Esse resultado foi confirmado pela análise de Tuckey, sem levantamento de diferença significativa entre os grupos.

Portanto, foi possível concluir que existiu viabilidade celular quando as células foram cultivadas em contato com o L2F, independente das proporções analisadas no presente estudo.

4.8 PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO

O L2F possui características condizentes a várias aplicações médicas *in situ*, como aquela simulada na perfuração timpânica descrita anteriormente.

A característica do L2F com 1% de vitrocerâmico com maior transparência, maleabilidade e ausência de potencial osteoindutor permite, possivelmente, a aplicação na oftalmologia, na produção de lentes ou de córnea sintética por meio de moldes ou bioimpressão (GOODARZI, et al., 2019). A união do vitrocerâmico nesse caso, proporciona maior estabilidade estrutural da peça do que o hidrogel individualizado, sem interferir na propriedade de transparência, como pode ser observado na figura 11. A aplicação por via injetável mostra, também, potencial de aplicação em cirurgias como a laminectomia, de maneira a prevenir as adesão cicatricial pós-cirúrgica (CENCETTI et al., 2011).



Figura 11. Transparência em gota solidificada do L2F em proporção de 1% vitrocerâmico.

Outra aplicação potencial do L2F na proporção de 1% ou 2% vitrocerâmico é como biotinta, funcionando como aporte para crescimento celular, ou impressão conjunta com células e outros tipos de biotintas, como as fugitivas (KOLESKY et al., 2014) para a formação de tecidos vascularizados, ou para impressão na prototipagem de órgãos (NOOR et al., 2019). Essa aplicação pode ser sugerida pela observação da viabilidade celular apresentada em contato com o L2F, e pelo potencial de injeção em temperaturas amenas.

A proporção de 2% vitrocerâmico poderia ser aplicada na forma injetável, de acordo com os resultados das análises, em tecidos ósseos e cartilagosos durante cirurgias ortopédicas para auxílio na cicatrização tecidual, devido à sua capacidade osteoindutora, e devido à sua aderência ao tecido ósseo circundante e endurecimento instantâneo por irrigação com soro fisiológico, como observado no teste de aplicação na peça de osso temporal.

A aplicação em bioimpressão é também uma importante aplicação para o L2F com maior concentração de vitrocerâmico, por apresentar maior rigidez depois de curado e potencial osteoindutor. Pode, portanto, ser usado na fabricação de próteses personalizadas e implantes destinados aos tecidos ósseo e cartilagosos. O aperfeiçoamento do biomaterial para essa aplicação pode ser realizado por bioimpressão via extrusão úmida com banho de cálcio e posterior maturação com meio de cultivo osteoindutor. Outra possibilidade é o revestimento da peça impressa por uma camada de vitrocerâmico para aumento da concentração superficial do mesmo e, conseqüentemente, do potencial osteoindutor (LEE et al., 2013).

5. CONCLUSÕES

A obtenção do biocomposito por diferentes concentrações permitiu o desenvolvimento de dois hidrogéis com proporções e aplicabilidades distintas sendo as proporções mais adequadas definidas por 1% e 2% de vitrocerâmico. As proporções testadas apresentaram solidificação instantânea em contato com fluido corpóreo simulado e solução de Ca^+ além da capacidade de aplicação por meio de extrusão e fácil aplicação *in situ*. O cultivo celular sugere a biocompatibilidade do novo biomaterial pela viabilidade celular apresentada durante o período de exposição em ambas as concentrações. No entanto, a diferença observada no potencial osteoindutor entre as formulações, destinam os materiais a aplicações distintas, sendo a concentração de 1% mais favorável a aplicações gerais como carreador de fármacos e células ou ainda ao desenvolvimento de órgãos sintéticos por tecnologia de bioimpressão, enquanto a concentração de 2%, mostra melhor aplicação na medicina regenerativa dos tecidos ósseo e cartilaginoso. Entretanto, experimentos complementares se fazem necessários para avaliação da segurança da aplicação do biocompósito em interação com o organismo.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A continuidade dos testes do novo biomaterial formado, é indispensável. Portanto, está previsto em primeiro momento, a realização dos seguintes testes:

- Biodegradabilidade, para previsão do tempo necessário para substituição do tecido sintético pelo natural;
- Análise da capacidade de encapsulamento celular do hidrogel para avaliação do potencial de aplicação na medicina regenerativa como carreador de células;
- Avaliação do potencial de diferenciação em outras linhagens;
- Aplicação do hidrogel in vivo para estudo da interação fisiológica e metabolização;
- Desenvolvimento de possíveis estratégias de melhoria no desempenho osteoindutor;

7. ANEXOS

Florence 12.10.2019

The Brazilian biomaterial is a ceramic-gum heat sensitive matter that I found pretty useful and versatile in performing bony reconstruction in a fresh frozen specimen of temporal bone. It is ductile and mallaleable. It can be modelled with a spate and, when injected through a needle, it takes and keeps a cylindrinc shape of different sizes according to that of the needle used. It is also has adhesive properties that allow tri-dimesional shaping of structures. Particularly, modelled with a spate, it has proven useful to seal gaps accidentally cut open during sharp dissection of the tegmen timpani and sigmoid sinus. Injected with a syringe, instead, it produces cylinders that it easily allowed me to rebuild the posterior canal wall in a progressive fashion, one over each other, from medial to lateral. Finally, injected with a small (20G+) needle, it allows the production of a trabecular structure that resembles that of the naive mastoid. From a surgical perspective this biomaterial is very suitable for performing bony reconstruction in otological and, extrapolating from this experience on which I have just reported, probably also rhinolaringolocial surgery. The necessity for further studies on biocompatibility, mesenchymal cell invasion and colonization, and transformation into newly formed bone is granted.

Dr. Glauco Cristofaro

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2008.

ABTO, Registro Brasileiro de Transplantes. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 2019. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=552&c=1039&s=0&friendly=estatisticas>

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. supl 1, p. 25-35, 2009.

CENCETTI, Claudia et al. Preparation and characterization of a new gellan gum and sulphated hyaluronic acid hydrogel designed for epidural scar prevention. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 22, n. 2, p. 263-271, 2011.

DANTI, Serena et al. Development of tissue-engineered substitutes of the ear ossicles: PORP-shaped poly (propylene fumarate)-based *scaffolds* cultured with human mesenchymal stromal cells. **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. 92, n. 4, p. 1343-1356, 2010.

DANTI, Serena et al. Growing bone tissue-engineered niches with graded osteogenicity: an in vitro method for biomimetic construct assembly. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 19, n. 12, p. 911-924, 2013.

DEASY, P. B.; QUIGLEY, Karen J. Rheological evaluation of deacetylated gellan gum (Gelrite) for pharmaceutical use. **International journal of pharmaceuticals**, v. 73, n. 2, p. 117-123, 1991.

FLEMING, K. K.; HUBEL, Allison. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 34, n. 3, p. 309-315, 2006.

FORGET, Aurelien et al. Mechanically tunable bioink for 3D bioprinting of human cells. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 20, p. 1700255, 2017.

GALIPEAU, Jacques et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 151-159, 2016.

GOODARZI, Hamid et al. Preparation and in vitro characterization of cross-linked collagen–gelatin hydrogel using EDC/NHS for corneal tissue engineering

applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 126, p. 620-632, 2019.

GRAHAM, Sarah; MARINA, Paula Facal; BLENCOWE, Anton. Thermoresponsive polysaccharides and their thermoreversible physical hydrogel networks. **Carbohydrate polymers**, v. 207, p. 143-159, 2019.

GROLL, Jürgen; HUTMACHER, Dietmar Werner. How smart do biomaterials Q 2 need to be? A translational science and clinical point 2 of view☆.

GUVENTIREN, Murat et al. Designing biomaterials for 3D printing. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 2, n. 10, p. 1679-1693, 2016.

HARJULA, Ari; HÖCKERSTEDT, Krister. **Atlas of clinical transplantation**. Recallmed, 1995.

HEATH, D. E.; COOPER, S. L.; **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press: Oxford cap. 1.2.2. Polymers: Basic Principles. 2013.

HEATH, Daniel E.; COOPER, Stuart L. Polymers: basic principles. In: **Biomaterials science**. Academic Press, 2013. p. 64-79.

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.

JI, Shen; GUVENTIREN, Murat. Recent advances in bioink design for 3D bioprinting of tissues and organs. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 23, 2017.

KANENO, R. Imunologia do Transplante. Depto Microbiologia e Imunologia IBB – UNESP. p. 1-5. 2003.

KOLESKY, David B. et al. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. **Advanced materials**, v. 26, n. 19, p. 3124-3130, 2014.

LAMB, David. **Transplante de órgãos e ética**. Hucitec, 2000.

LEE, Ju-Yeon et al. Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering. **Biofabrication**, v. 5, n. 4, p. 045003, 2013.

LI, Jipeng et al. Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects. **Journal of translational medicine**, v. 14, n. 1, p. 271, 2016.

LOBO, Sonja E. et al. 11–Resposta de células-tronco de diferentes origens a biocerâmica de fosfato de cálcio bifásico.

LORO, Raphael Carlos Drumond et al. O papel de um arcabouço de osso alógeno e de um meio de cultura na osteogênese de células tronco adultas da medula óssea humana. 2009.

LOTT, K. E. et al. Clonal analysis of multipotent differentiation of human adipose-derived adult stem cells. **Trans. Orthop. Res. Soc**, v. 29, p. 162, 2004.

MACHADO, Calixto. The first organ transplant from a brain-dead donor. **Neurology**, v. 64, n. 11, p. 1938-1942, 2005.

MARYCZ, Krzysztof et al. Influence of modified alginate hydrogels on mesenchymal stem cells and olfactory bulb-derived glial cells cultures. **Bio-medical materials and engineering**, v. 24, n. 3, p. 1625-1637, 2014.

MELCHELS, Ferry PW et al. Additive manufacturing of tissues and organs. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 8, p. 1079-1104, 2012.

MIYOSHI, Emako; TAKAYA, Tomohisa; NISHINARI, Katsuyoshi. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, n. 2-3, p. 109-119, 1996.

MOSCATO, Stefania et al. Poly (vinyl alcohol)/gelatin hydrogels cultured with HepG2 cells as a 3D model of hepatocellular carcinoma: a morphological study. **Journal of functional biomaterials**, v. 6, n. 1, p. 16-32, 2015.

MOUSER, Vivian HM et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 035003, 2016.

NAIR, Lakshmi S.; LAURENCIN, Cato T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in polymer science**, v. 32, n. 8-9, p. 762-798, 2007.

NOH, Insup et al. 3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. **Biomaterials research**, v. 23, n. 1, p. 3, 2019.

NOOR, Nadav et al. 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. **Advanced Science**, p. 1900344, 2019.

NUSSBAUM, R.L. et. al.. Thompson & Thompson – Genética Médica. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

NYAME, Theodore T. et al. Tissue-engineered skin substitutes. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 136, n. 6, p. 1379-1388, 2015.

O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials today**, v. 14, n. 3, p. 88-95, 2011.

ODT, U.S. Government Information on Organ Donation and Transplantation, 2019 Disponível em: <http://www.organdonor.gov>

OLIVEIRA, João T. et al. Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. **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. 93, n. 3, p. 852-863, 2010.

OLIVEIRA, Rafaella Denezine de et al. Análise do comportamento de células tumorais pulmonares A549 em contato com scaffold biológico. 2019.

OLIVEIRA, Rodrigo Cardoso de et al. Análise comparativa da remodelação da matriz, angiogênese e neoformação óssea durante o reparo de defeito crítico tratado com osso autólogo ou xenoinxerto desmineralizado. 2005.

ONOFRILLO, Carmine et al. Biofabrication of human articular cartilage: a path towards the development of a clinical treatment. **Biofabrication**, v. 10, n. 4, p. 045006, 2018.

OZBOLAT, Ibrahim T.; YU, Yin. Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 60, n. 3, p. 691-699, 2013.

PEREIRA, Walter A. Manual de transplantes de órgãos e tecidos. In: **Manual de transplantes de órgãos e tecidos**. 2004.

PIRES, Ana Luiza R.; BIERHALZ, Andréa CK; MORAES, Ângela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

POMPEU, LLMFP et al. Aluminatos de cálcio e seu potencial para aplicação em endodontia e ortopedia. **Cerâmica**, v. 59, p. 216-224, 2013.

PUERTAS-BARTOLOMÉ, María et al. Bioadhesive functional hydrogels: Controlled release of catechol species with antioxidant and antiinflammatory behavior. **Materials Science and Engineering: C**, v. 105, p. 110040, 2019.

QU, Jin et al. Biocompatible conductive hydrogels based on dextran and aniline trimer as electro-responsive drug delivery system for localized drug release. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 255-264, 2019.

RATNER, B. D.; Ho man, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*; Academic Press, 2013.

RESENDE, Cristiane Xavier. Estudo Teórico–Experimental de Duas Soluções para Testes de Bioatividade e Revestimento de Metais. **Rio de Janeiro**, 2007.

ROGAN, Heather et al. Microribbon-hydrogel composite scaffold accelerates cartilage regeneration in vivo with enhanced mechanical properties using mixed stem cells and chondrocytes. **Biomaterials**, v. 228, p. 119579, 2020.

ROTTENSTEINER-BRANDL, Ulrike et al. Encapsulation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells in alginate dialdehyde/gelatin microbeads with

and without nanoscaled bioactive glass for in vivo bone tissue engineering. **Materials**, v. 11, n. 10, p. 1880, 2018.

RUANO, Javier Collado. Reflexões filosóficas sobre a Educação para o Desenvolvimento Sustentável: uma abordagem complexa, transdisciplinar e biomimética. **Foro de Educación**, n. 26, p. 135-152, 2019.

SCHAFER Liver Transplantation. Looking Back, Looking Forward. Transplantation of the Liver. In: Maddrey C.W., Schiff E.R., Sorrell M.F., Lippincott Williams & Wilkis, Philadelphia. 2001.

SINHORETI, Mário Alexandre Coelho; VITTI, Rafael Pino; CORRER-SOBRINHO, Lourenço. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgões Dentistas**, v. 67, n. 4, p. 256-261, 2013.

SOUSA, Jônatas et al. Osteoinduction test of anorthite by human mesenchymal stem cell culture. **Materials Research**, v. 15, n. 2, p. 224-228, 2012.

STEVENS, L. R. et al. Tissue engineering with gellan gum. **Biomaterials science**, v. 4, n. 9, p. 1276-1290, 2016.

SUO, Hairui et al. Glucosamine-grafted methacrylated gelatin hydrogels as potential biomaterials for cartilage repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2019.

THOMAS, E. Donnall. Bone marrow transplantation: a historical review. **Medicina**, v. 33, n. 3, p. 209-218, 2000.

TIAN, Huayu et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 2, p. 237-280, 2012.

TRAPPMANN, Britta et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. **Nature materials**, v. 11, n. 7, p. 642, 2012.

VIEIRA, Sílvia et al. Self-mineralizing Ca-enriched methacrylated gellan gum beads for bone tissue engineering. **Acta biomaterialia**, 2019.

VIVIAN, Bruna Bitencourte. Reconstrução da articulação temporomandibular anquilosada com enxerto autógeno ou prótese aloplástica. 2017.

WANG, Zhifang et al. 3D-printable self-healing and mechanically reinforced hydrogels with host-guest non-covalent interactions integrated into covalently linked networks. **Materials Horizons**, v. 6, n. 4, p. 733-742, 2019.

WILLIAMS, David F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

WONG, J. Y.; BRONZINO, J. D.; **Biomaterials, Taylor & Francis Group: New York**, 2007.

