

BIOIMPRESSÃO 3D DE HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR DE OSSO ASSOCIADO COM HIDROGEL DE CARTILAGEM

Autores: Íris Bomjestab Vittoraci, Ezio Henrique da Silva Gomes, Alessandra Ferreira Gomes, Lays Cristine Gonçalves Mattos, Tadeu Ériton Caliman Zanardo, Breno Valentim Nogueira

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências da Saúde, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe – 29047-105 – Vitória – ES, Brasil, iris.vittoraci@edu.ufes.br, eziohrs@gmail.com, alefg.bio@gmail.com, lays.g.mattos@gmail.com, tadeucz@hotmail.com, brenovalentim@gmail.com

Resumo

A bioimpressão tridimensional para a medicina regenerativa utiliza biomateriais, células e/ou biotintas para produzir estruturas desejadas que retratem os aspectos estruturais, composicionais e funcionais de vários tecidos biológicos, incluindo o ósseo. Diversos métodos de bioimpressão têm sido utilizados para reparo regenerativo ósseo uma vez que as lesões ósseas ainda são consideradas um desafio na ortopedia e, levando em consideração os inconvenientes ainda presentes com os enxertos ósseos, a bioimpressão surge como uma estratégia promissora. Desse modo, o presente projeto objetiva avaliar a combinação de hidrogéis a base de matriz extracelular proveniente de osso bovino descelularizado associado ao hidrogel de cartilagem descelularizada para sua aplicação na bioimpressão 3D de *scaffolds*. Para isso, foi realizada a produção dos hidrogéis e combinações em concentrações: 50% hidrogel osso com 50% hidrogel cartilagem; 30% hidrogel osso com 70% do hidrogel cartilagem e 30% hidrogel cartilagem com 70% hidrogel osso, seguido de sua prototipagem e impressões. Observou-se que os hidrogéis nas concentrações 50% hidrogel osso com 50% hidrogel cartilagem e 30% hidrogel cartilagem com 70% hidrogel osso apresentaram maior elasticidade para utilização na bioimpressão 3D de *scaffolds*.

Palavras-chave: Bioengenharia de tecidos; Bioimpressão 3D; Hidrogel; Osso; Cartilagem.

Área do Conhecimento: Engenharias – Engenharia Biomédica

Introdução

A busca por soluções inovadoras na área da medicina regenerativa tem impulsionado estudos de biomateriais e técnicas com capacidade para promover a regeneração eficaz de lesões ósseas e, nesse contexto, a bioengenharia tecidual tem sido considerada uma estratégia cada vez mais promissora (FERNANDEZ-YAGUE et al., 2015; SAWKINS et al., 2015; NOBRE, 2016). Uma subárea da bioengenharia é a bioimpressão tridimensional (3D), que consiste em métodos para construir formas complexas através do depósito ou endurecimento de materiais camada por camada (BOURZAC, 2017). A manufatura aditiva tradicional trabalha com procedimentos no qual um objeto físico 3D é construído camada por camada com base em dados de um Desenho Auxiliado por Computador (CAD), utilizando materiais como plástico industrial, vidro, metal, cerâmica etc., porém, na bioimpressão 3D utilizam-se materiais biocompatíveis, como os hidrogéis, para a fabricação de tecidos biológicos ou órgãos (SHAPIRA; DVIR, 2021), como por exemplo o osso, podendo, assim, essa ser uma técnica para auxiliar no reparo de lesões e defeitos ósseos.

Defeitos ósseos são ainda considerados como um grande desafio na prática ortopédica, podendo ser resultante de um evento traumático de alta energia, de diferentes doenças, como tumor ou infecção, pseudoartroses e outros (CALORI et al., 2011). Com isso, os tratamentos mais utilizados para fraturas e defeitos ósseos incluem essencialmente enxertos e próteses metálicas.

Considerando que ossos proporcionam sustentação para o corpo, proteção de estruturas vitais, armazenam sais, realizam hematopoiese e compõem o aparelho locomotor (MOORE; DALLEY; AGUR, 2019), urge a necessidade de constantes investigações relacionadas à regeneração e reparo desse tecido com o intuito de reduzir os graves impactos de pacientes acometidos por lesões ósseas. No entanto, os tratamentos comumente utilizados, que envolvem enxertos e transplantes, estão

associados a alguns inconvenientes, tais como morbidade do lado doador, infecção, dor crônica, resposta imune grave, integração lenta com tecido nativo e limitações relativas à quantidade e/ou qualidade do osso a colher (CALORI et.al., 2011; GAZDAG et.al., 1995). Alicerçado a isso, um dos materiais estudados para a aplicação na bioimpressão 3D são os hidrogéis, que são considerados redes poliméricas com estrutura tridimensional e com alta capacidade de retenção de água, podendo esses serem a base de Matriz Extracelular (MEC). Esses hidrogéis propiciam a proliferação de células e deposição de moléculas bioativas e podem ser feitas a partir de diversos tecidos (CHAMPEAU et al., 2020) inclusive do osso e da cartilagem.

Por fim, diante dos fatos supracitados, o presente projeto tem como objetivo principal produzir *scaffolds* por meio da bioimpressão 3D de hidrogel de MEC proveniente de osso bovino descelularizado associado ao hidrogel de cartilagem, podendo este biomaterial contribuir para a aceleração do reparo ósseo.

Metodologia

1. Aquisição dos materiais

As amostras de osso bovino foram doadas pelo açougue Barão das Carnes - Vitória/ES, com autorização prévia para experimentação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES – Processo 48/2018) e transportadas até o laboratório em caixas de isopor com gelo, onde foram higienizadas em solução de bicarbonato de sódio 3% e cortadas com serra fita em blocos de 2x2cm.

2. Descelularização

Os blocos de ossos foram descelularizados separados em garrafas de 500ml e todo o processo de descelularização foi realizado sob agitação contínua na Incubadora Shaker (SL-223) à 37°C e 200rpm. No primeiro momento, os ossos foram descelularizados por imersão em com 400ml de solução de Tris-HCl (10mM, pH 7,8), SDS (4% m/v) e EDTA (1,6% m/v) por 7 dias, com trocas a cada 12 horas. Após isso, as amostras foram submetidas a lavagens etapas desengordurantes de 1 hora com 400ml de em solução de Metanol e Clorofórmio (1:1) por 4 dias, intercaladas com lavagens com SDS 4% com trocas a cada 12 horas. Em seguida, foram realizadas lavagens com PBS (1x) por 96 horas, também com trocas a cada 12 horas. Ao final, o material foi colocado em uma solução clareadora de peróxido de hidrogênio 35% seguido de duas lavagens de PBS (1x) por 30 minutos cada. Por fim, os ossos foram secos em estufa a 37°C, moídos e desmineralizados com solução de HCl 0,5M (25ml/g).

3. Quantificação do DNA

As amostras de ossos nativos e descelularizado foram colocadas em microtubos de 1,5ml estéreis com solução de lise composta por 410 µL de buffer de extração (0,2ml Tris 1M pH 8 / 0,4ml NaCl 5M / 0,4ml EDTA 0,5M pH 8 / 19ml de água ultrapura), 80µl de SDS à 10% e 15µL de proteinase K (Ludwig Biotec) (20µg/µL). Depois, foram incubados à 55 °C overnight até completa digestão. Em seguida centrifugados a 13.700rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos, onde adicionou-se 180 µL de NaCl 5M, homogeneizando até a formação de um precipitado de cor branca. Após nova centrifugação, foram adicionados 800µL de isopropanol gelado ao sobrenadante. Os microtubos foram homogeneizados e centrifugados a 13.700 rpm, dessa vez por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. No tubo remanescente, foi adicionado 250µL de etanol à 80% e homogeneizados suavemente, processo que foi repetido mais uma vez. Foi realizada novamente a centrifugação dos microtubos a 13.700rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi descartado. O etanol residual foi evaporado à 55°C por 30 minutos em estufa estéril. O DNA presente nos microtubos das amostras foi suspenso em 50µL de água ultrapura e mantidos overnight em geladeira (4 °C) para diluição. Ao final, realizou-se a leitura em equipamento espectrofotômetro (Modelo NanoDrop® 2000, Thermo Scientific).

4. Análise histológica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análises histológicas, as amostras de tecido descelularizado foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4% tamponada com PBS e incorporadas em Historesina (Leica Historesin Embedding Kit, Alemanha), emblocadas e polimerizadas à temperatura ambiente. Os blocos foram seccionados com a utilização de um micrótomo manual (Leica RM 2125, Alemanha) em seções de 5 µm de

espessura e coradas por hematoxilina e eosina (HE) e picrossírius. As imagens foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico. Para as análises ultraestruturais do osso bovino descelularizado e do hidrogel produzido foram fixadas em Karnovsky e preservadas a uma temperatura de 4°C. Em seguida, ocorreu a etapa de pós-fixação em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e tetróxido de ósmio 1%, por 1 hora em temperatura ambiente. Após isso, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcool com duração de 30 minutos cada. A seguir, o material foi submetido ao ponto crítico (Autosandri-815, Tousimis), posicionado sobre *stubs* e metalizadas (20nm) em metalizador (Desk V, Denton Vacuum). A análise e fotografia dos materiais foi realizada com o Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol, JEM6610 LV, operado com filamento de Tungstênio a 20kV.

5. Produção do hidrogel

A primeira etapa consiste na digestão enzimática, na qual foi utilizado uma solução de pepsina (1mg/ml) / HCl (0,001M pH 2-3) durante 72 horas, produzindo, assim, a solução pré-gel. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,4 com uso de NaOH e HCl, visando a inativação da ação da pepsina. Após isso, o hidrogel foi liofilizado para remover a água e manter apenas a estrutura polimérica da MEC. O hidrogel de MEC de osso foi reidratado na concentração de 6 mg/ml. O hidrogel de MEC cartilaginosa utilizado foi o MatriXpec™ Cartilage, proveniente da TissueStart™ (Tissue Labs, Suíça). Por fim, foram associados os hidrogéis de MEC de osso e cartilagem (V/V) nas concentrações de: 50% hidrogel osso com 50% hidrogel cartilagem; 30% hidrogel osso com 70% do hidrogel cartilagem e 30% hidrogel cartilagem com 70% hidrogel osso.

6. Bioimpressão 3D

A prototipagem dos modelos 3D foi realizada por meio da utilização do software Autodesk Fusion – um software de CAD 3D – enquanto o fatiamento e controle de comandos foi feito no sistema Repetier Host V2.1.6 com adaptações TissueStart™ Control para a bioimpressora TissueStart™. Em seguida, para a bioimpressão, o hidrogel foi depositado em seringas de 5ml compatível com a bioimpressora. A partir disso, iniciou-se o processo de impressão dos *scaffolds* que tem dimensões e características definidas de acordo com a necessidade da peça, e foram impressos em lâminas de vidro.

Foram desenvolvidos modelos 3D de um fêmur utilizando o software AutoDesk Fusion e fatiados com vista de camadas no Repetier Host V2.1.6 adaptado para a bioimpressora TissueStart™.

Uma vez verificados os parâmetros de bioimpressão, foram iniciados os testes com os hidrogéis de MEC. Todas as bioimpressões de *scaffolds* foram realizadas com seringas estéreis de 5ml com extrusora de 22G e com configurações de 0,1mm de altura de camada, 99% de densidade do enchimento, padrão de enchimento *honeycomb* e enchimento sólido *rectilinear*.

7. Análise estatística

A análise estatística será realizada com a utilização do software GraphPad Prism 7.0 e serão utilizados os testes de one-way ANOVA seguido de teste de Tukey, onde serão considerados valores em que $p < 0,05$.

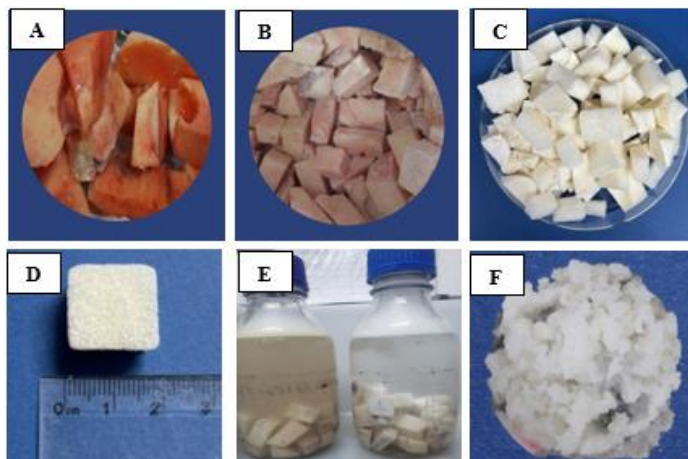
Resultados

1. Descelularização dos ossos bovinos

Após o processo de descelularização foi observado que os ossos perderam a coloração avermelhada e se tornaram esbranquiçados (Fig. 1). Além disso, o material aparentou haver menos gordura em sua composição, entretanto ainda houve a manutenção do formato dos blocos.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 1 – (a) Ossos antes da higienização (b) Ossos higienizados e cortados (c) Ossos descelularizados. (d) Tamanho dos ossos descelularizados. (e) Ossos antes e depois das lavagens desengordurantes. (f) Ossos moídos e desmineralizados.



Fonte: Autor.

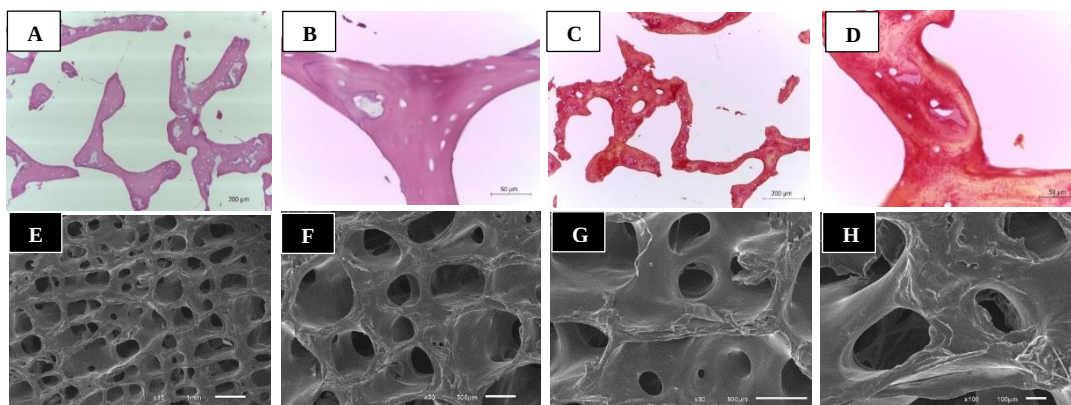
2. Quantificação de DNA

Após o processo de descelularização observou-se uma redução significativa do conteúdo de DNA: amostras nativas = $246,22 \pm 119,08$ ng de DNA por peso de tecido seco vs. amostras descelularizadas = $20,35 \pm 9,76$ ng de DNA por peso de tecido seco.

3. Análise Histológica e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise histológica sob coloração de H&E apresenta ausência de debris celulares e núcleos. A coloração histoquímica evidenciou a permanência de fibras colágenas (Fig. 2 - A, B, C, D). Além disso, na análise sob microscopia eletrônica de varredura, nota-se porosidade e manutenção da microarquitetura e arcabouço ósseo (Fig. 2 - E, F, G, H).

Figura 2 – Análise sob microscopia óptica dos ossos bovinos descelularizados corados com Hematoxilina e Eosina (A e B) e Picrosirius (C e D). Barra de escala: A e C: 200µm, B e D: 50µm. Microscopia eletrônica de varredura da microarquitetura dos ossos bovinos descelularizados (E, F, G, H). Barra de escala: E: 1mm, F e G: 500µm, H: 100µm.



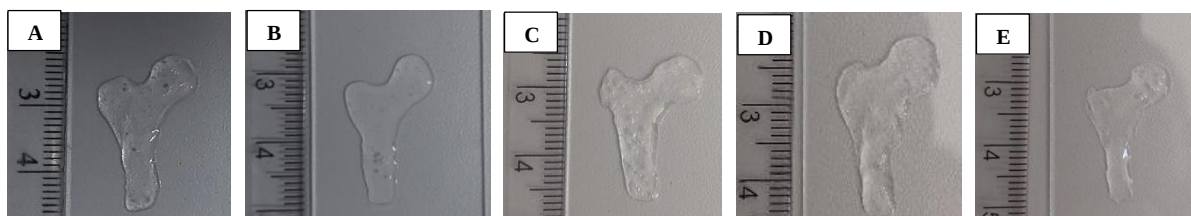
Fonte: Autor.

4. Prototipagem e Bioimpressão 3D

Inicialmente, foi feita a impressão com 100% de hidrogel de cartilagem e outra com 100% de hidrogel de osso, no entanto, observou-se que os materiais em questão não atingiam viscosidade e consistência ideais para a impressão dos *scaffolds*. Portanto, foi adicionado o MatriXpec™ GelMA Bone, proveniente da TissueStart™ à concentração de 15% (v/v), um material projetado a base de gelatina metacrilada, a fim de tornar os hidrogéis de MEC descelularizado mais elásticos. Após a adição do GelMA, os *scaffolds* com 100% de hidrogel de osso e com 100% de hidrogel de cartilagem tornaram-se mais elásticos, permitindo assim sua impressão (Fig. 3 – A, B). Além disso, foram realizadas comparações com as diferentes concentrações dos materiais juntamente com o MatriXpec™ GelMA Bone (Fig. 3 – C, D, E).

Pode-se observar que visualmente, os hidrogéis contendo 100% de material ósseo e 100% de material cartilaginosos se apresentaram menos espessos e gelatinosos. No entanto, ao associar os dois, os hidrogéis com 30% de material cartilaginoso e 70% de material ósseo e 50% de material cartilaginoso e 50% de material ósseo apresentaram melhor consistência. Porém, ao aumentar a concentração do hidrogel de cartilagem no hidrogel contendo 30% de hidrogel de osso e 70% de hidrogel de cartilagem, a consistência volta a se aproximar de líquida, dificultando a bioimpressão.

Figura 3 – Modelo 3D de cabeça de fêmur bioimpresso. (a) Hidrogel de osso e 15% de GelMA. (b) Hidrogel de cartilagem e 15% de GelMA. (c) 50% de hidrogel de osso, 50% de hidrogel de cartilagem e 15% GelMA. (d) 30% de hidrogel de cartilagem, 70% de hidrogel de osso e 15% GelMA. (e) 30% de hidrogel de osso, 70% de hidrogel de cartilagem e 15% GelMA.



Fonte: Autor.

Discussão

Após a execução das etapas do trabalho, é possível concluir que houve eficiência no processo de descelularização, realizada por imersão em SDS, detergente que solubiliza as membranas celulares e nucleares removendo as células e é comumente o mais utilizado (HE, et al., 2017), uma vez que o material apresentou aspecto esbranquiçado, o que sugere a remoção de células (SAWKINS, et al., 2013). Ademais, a quantificação de DNA residual é considerada padrão ouro para confirmar o sucesso de um processo de descelularização quando apresenta quantidade de DNA inferior a 50ng/mg de tecido seco (CRAPO; GILBERT; BADYLAK, 2011), o que também confirma a eficácia, tendo em vista que apresentou redução significativa de cerca de 91,7%.

As análises microscópicas evidenciaram também a remoção celular, além da manutenção de algumas proteínas de matriz extracelular e da porosidade e arquitetura do tecido. Tais achados indicam que o protocolo adotado removeu de forma satisfatória o conteúdo celular, mantendo as propriedades estruturais essenciais da matriz extracelular, garantindo a biocompatibilidade e baixa imunogenicidade necessárias para o material (NEISHABOURI et al., 2022).

Verificou-se que os hidrogéis de osso e de cartilagem, quando utilizados isoladamente, apresentaram baixa elasticidade adequada para bioimpressão. No entanto, a adição de GelMA mostrou-se eficiente para conferir maior elasticidade e viabilizar a impressão dos *scaffolds*, principalmente por possuir propriedades mecânicas como elasticidade, compressibilidade e dureza (KURIAN et. al., 2022). Esse material apresenta considerável interesse na comunidade de engenharia de tecidos devido à sua bioatividade inerente e adaptabilidade físico-química (KLOTZ et. al., 2015).

As associações dos hidrogéis de osso, cartilagem e GelMA resultou em composições mais elásticas para a bioimpressão 3D, principalmente nas proporções 50% de hidrogel de osso + 50% de hidrogel de cartilagem; e 70% de hidrogel de osso + 30% de hidrogel de cartilagem, que indica que a

combinação de diferentes matrizes em diferentes concentrações pode potencializar propriedades mecânicas para aprimorar a bioimpressão de *scaffolds*.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a combinação de hidrogéis de matriz extracelular de osso e cartilagem aumenta a elasticidade de hidrogéis, permitindo, assim, a bioimpressão de *scaffolds* que podem ser aplicados para a área da medicina regenerativa. Por fim, para trabalhos futuros, recomenda-se a realização de testes com culturas celulares a fim de avaliar a viabilidade, adesão e proliferação celular nos *scaffolds* bioimpressos.

Referências

- BOURZAC, K. Inner Workings: 3D printer innovations tackle complexity of metamaterials, living tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 16, p. 4034–4036, 2017.
- CALORI, G. M. et al. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? **Injury**, v. 42, p. S56–S63, set. 2011.
- CHAMPEAU, M. et al. 4D Printing of Hydrogels: A Review. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 31, p. 1910606, 2020.
- CRAPO, PM; GILBERT, TW; BADYLAK, SF Uma visão geral dos processos de descellularização de tecidos e órgãos inteiros. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233–3243, 2011.
- FERNANDEZ-YAGUE, M. A. et al. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 84, p. 1–29, 2015.
- GAZDAG, A. R. et al. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **JAAOS - Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 3, n. 1, p. 1, 1995.
- KLOTZ, Barbara J. et al. Gelatin-methacryloyl hydrogels: Towards biofabrication-based tissue repair. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 394–407, 2016.
- KURIAN, Amal George et al. Multifunctional GelMA platforms with nanomaterials for advanced tissue therapeutics. **Bioactive materials**, v. 8, p. 267–295, 2022.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. 8. ed. Rio De Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- NEISHABOURI, A. et al. Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: Evaluation, modification, and application methods. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 10, p. 805299, 2022.
- NOBRE, R. M. L. Hidrogéis: Potencial de aplicação em Engenharia de Tecidos. 2016. Tese de Doutorado.
- SAWKINS, M. J. et al. Cell and protein compatible 3D bioprinting of mechanically strong constructs for bone repair. **Biofabrication**, v. 7, n. 3, p. 035004, 2015.
- SAWKINS, M. J. et al. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 8, p. 7865–7873, 2013.
- SHAPIRA, A.; DVIR, T. 3D Tissue and Organ Printing—Hope and Reality. **Advanced Science**, v. 8, n. 10, p. 2003751, 2021.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) – EDITAL FAPES Nº 05/2024 - PIBICES 2024 e CNPq - #160990/2019-0.