

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Sarah Oliveira Lamas de Souza

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE GELATINA METACRILÓIL
COM CÉLULAS INCORPORADAS PARA ORGANÓIDES TUMORAIS E
HIDROGÉIS BASEADOS EM BIOMACROMOLÉCULAS CONTENDO
NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Belo Horizonte

2021

Sarah Oliveira Lamas de Souza

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE GELATINA METACRILÓIL
COM CÉLULAS INCORPORADAS PARA ORGANÓIDES TUMORAIS E
HIDROGÉIS BASEADOS EM BIOMACROMOLÉCULAS CONTENDO
NANOFIBRAS OBTIDAS POR ELETROFIAÇÃO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas.

Área de Concentração: Ciências e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Rodrigo Lambert Oréfice

Coorientadora: Dra. Luciana Maria Silva

Belo Horizonte

2021

S729s Souza, Sarah Oliveira Lamas de.
Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Gelatina Metacriol com Células Incorporadas para Organóides Tumoriais e Hidrogéis Baseados em Biomacromoléculas Contendo Nanofibras Obtidas por Eletrofição [recurso eletrônico] / Sarah Oliveira Lamas de Souza. – 2021.
1 recurso online (xii, 94 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Rodrigo Lambert Oréfice.
Coorientadora: Luciana Maria Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndice: f. 91-93.
Inclui Bibliografia.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia Metalúrgica - Teses. 2. Ciência dos Materiais – Teses. 4. Colóides - Teses. 5. Nanofibras – Teses. I. Oréfice, Rodrigo Lambert, 1968-. II. Silva, Luciana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 669(043)

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Letícia Alves Vieira - CRB-6/2337
Biblioteca Prof. Mário Werneck - Escola de Engenharia da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aos 29 (vinte e nove) dias do mês de janeiro de 2021, a tese intitulada "**Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Gelatina Metacrilol com Células Incorporadas para Organoides Tumorais e Hidrogéis Baseados em Biomacromoléculas Contendo Nanofibras Obtidas por Eletrofição**", área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais, apresentada pela candidata **Sarah Oliveira Lamas de Souza**, para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas, foi aprovada pela comissão examinadora constituída pelos seguintes membros: Dr. Rodrigo Lambert Oréfice - Orientador (UFMG), Dra. Luciana Maria Silva - Coorientadora (FUNED), Dra. Leticia da Conceição Braga (Instituto Mário Penna), Dr. Ricardo Geraldo de Sousa (UFMG), Dr. Isadora Cota Carvalho (UFMG) e Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei (UNICAMP).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Lambert Oréfice, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 13/04/2022, às 10:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1382322** e o código CRC **E3B20FD1**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e proteção, e por me mostrar os melhores caminhos durante esta caminhada.

Ao Arthur, pelo amor e incentivos. Por estar sempre ao meu lado nos momentos importantes da minha vida. A Laurinha pelo carinho e alegria de todos os dias.

À toda a minha família, mãe, irmãos, cunhada, sobrinha Lis pelo apoio incondicional de todas as horas.

Ao orientador Rodrigo Lambert Oréfice, a quem muito admiro. Agradeço pela dedicação, compreensão, incentivos e pela amizade desses anos.

À Luciana Silva Maria pela coorientação, por disponibilizar o seu laboratório de Biologia Celular na FUNED e me deixar a vontade para conduzir os experimentos.

Aos colegas do LEPCom, em especial a Érica, Gabriella, Giovanni, Monique, Bruna, Diego, Catarina e Manuela, pela convivência e contribuições.

Ao Sérgio pela amizade e pela parceria essencial na reta final do doutorado.

À Marys, Eliane, e Janaína pelas contribuições, parcerias e pela amizade, aos agradáveis momentos juntas.

À Mercês Silva pela contribuição com a extração do monocristal de celulose.

À Patrícia Azevedo pelas análises de MEV e pelas dicas com o equipamento AFM.

Ao Breno com as análises de μ -cT

Ao pessoal da FUNED pelas ajudas com os experimentos e convivência no laboratório, em especial a Cris, Heloisa, Milene, Marco, Hizanna, Bianca e Ana Paula.

À Alessandra Matavel, pela contribuição neste trabalho e por disponibilizar o Laboratório de Eletrofisiologia da FUNED.

manterem as vidrarias do laboratório de Biologia Celular sempre limpas e estéreis para os experimentos biológicos.

À professora Annamaria Vago e ao Victor Payano pelo preparo das lâminas histológicas no laboratório de Patogênese Molecular no ICB, UFMG.

Ao CTNano, UFMG, em especial a Glaura Silva e a Milene por disponibilizar o Óxido de Grafeno reduzido.

A todos do Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas - UFMG, em especial, à Cida.

A CAPES pela concessão de bolsa de doutorado e aos órgãos de fomento CNPq e FAPEMIG pelos auxílios concedidos.

Agradeço a todos que de alguma forma, contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

Sistemas de cultura celular tridimensional têm sido usados como métodos alternativos *in vitro* a fim de melhorar a simulação de condições no organismo vivo. Entre as várias opções de matriz baseadas em scaffold disponíveis para a cultura de células 3D, os hidrogéis, que são redes macromoleculares formadas por polímeros hidrofílicos intumescidos em água ou fluidos biológicos, são altamente promissores devido a sua similaridade com o meio natural. A gelatina metacrilóil (GelMA) é um hidrogel fotopolimerizável com potencial para aplicações em engenharia de tecidos, em especial cultivo de células *in vitro*, auxiliando a formação dos organoides. O GelMA pode ser utilizado na formação de organoides tumorais como possibilidade de fazer triagem de drogas, imunoterapia e até mesmo descobertas relacionadas ao prognóstico. Nesse trabalho foi desenvolvido um dispositivo de GelMA com diferentes níveis de metacrilção na presença de células RKO AS45-1 (linhagem celular de carcinoma de cólon humano) como possível organoide tumoral, e foram incorporados nanocristais de celulose e óxido de grafeno reduzido ao sistema para auxiliar na melhora das propriedades mecânicas e elétricas desses hidrogéis. A capacidade de intumescimento da GelMA em água mostrou que os hidrogéis com maiores níveis de metacrilção foram mais estáveis em relação à degradação / dissolução. Os resultados mostraram que a presença de nanocristal de celulose (NCC) foi capaz de fornecer estabilidade mecânica aos hidrogéis em frequências mais altas (até 200Hz). Os testes de viabilidade demonstraram que as células RKO AS45-1 foram capazes de ser encapsuladas em hidrogéis. Além desses nanocompósitos, nanofibras de policaprolactona (PCL)/GelMA também foram incorporadas e melhoraram as propriedades mecânicas dos hidrogéis. Maior número de camadas de nanofibras nos hidrogéis levou a mais elevadas propriedades mecânicas em comparação com hidrogéis com um menor número de camadas, além de contribuírem na adesão e proliferação celular. Os hidrogéis com células encapsuladas após 24 horas de cultura celular mostraram que a taxa de proliferação celular foi maior nos hidrogéis híbridos do que nos hidrogéis GelMA puros.

Palavras-chave: Hidrogéis, Gelatina metacrilóil (GelMA); Organoides; Nanofibras.

ABSTRACT

Three-dimensional cell culture systems have been used as an alternative method *in vitro* to improve the simulation of the living organism. Among the various scaffold-based matrix options available for 3D cell culture, hydrogels, which are macromolecular networks formed by water-swollen hydrophilic polymers or biological fluids, are highly promising because of their similarity to the natural environment. Methacryloyl gelatin (GelMA) is a photopolymerizable hydrogel with potential for tissue engineering applications, in particular cell culture *in vitro*, helping the formation of organoids. GelMA can be used in the formation of tumor organoids as a possibility to screen for drugs immunotherapy and even findings related to prognosis. In this work, a GelMA device was developed with different levels of methacryloyl in the presence of RKO cells as a possible tumor organoid, and cellulose nanocrystals and reduced graphene oxide were incorporated into the system to help improve the properties of these hydrogels. The swelling capacity of GelMA in water showed that hydrogels with higher levels of methacrylation were more stable in relation to degradation / dissolution. The results showed that the presence of cellulose nanocrystal (NCC) was able to provide mechanical stability to hydrogels at higher frequencies (up to 200Hz). Cellular viability demonstrated that RKO AS45-1 (colon carcinoma cell line) cells were able to be encapsulated in hydrogels. In addition to these nanocomposites, PCL / GelMA nanofibers were also incorporated and improved the mechanical and electrical properties of hydrogels. Higher number of nanofiber layers in hydrogels led to higher mechanical properties than hydrogels with a lower number of layers besides contributing to cell adhesion and proliferation. Hydrogels with encapsulated cells after 24 hours of cell culture showed that the rate of cell proliferation was higher in hybrid hydrogels than in pure GelMA hydrogels

Keywords: Hydrogels; Methacryloyl gelatin (GelMA); Organoids; Nanofiber

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da reação da gelatina com o anidrido metacrílico.....	33
Figura 2 – Porosidade dos hidrogéis estudados por microscopia eletrônica de varredura (300x) e vistas laterais de modelos 3D obtidos por μ -CT (A). Curvas de distribuição do tamanho dos poros por μ -CT (B).....	41
Figura 3 – Espectros FTIR de GelMA NB, GelMA NA, gelatina e anidrido metacrílico (A), e espectros de GelMA NB e GelMA NA contendo NCC e rGO (B).....	43
Figura 4 – Comparação entre os procedimentos de intumescimento (A) e re-intumescimento (B) das amostras GelMA, GelMA-NCC e GelMA-rGO em função do tempo. Os valores do Índice de degradação dos hidrogéis também são mostrados em (C).....	45
Figura 5 – (A) Foto de um hidrogel entre placas de compressão para ser empregado em uma análise mecânica dinâmica (DMA) sob água DI; (B) Foto de um GelMA NA 10% NCC intumescido; (C) Foto de um GelMA NA rGO intumescido; (D) Módulo de elasticidade de armazenamento em função da frequência.....	48
Figura 6 – Valores médios do Módulo de Young pelo teste de nanoindentação para hidrogéis secos (A) e para hidrogéis intumescidos (B). (C) Uma imagem topográfica AFM representativa de uma indentação realizada na superfície de um hidrogel.....	49
Figura 7 – Resultados de viabilidade celular de hidrogéis por MTT (A); Comparação do número de células no grupo controle RKO AS45-1 e número de células presentes nos hidrogéis (B); Resultados de viabilidade da linhagem RKO AS45-1, obtido no ensaio LIVE DEAD, no período de 24 e 48 horas, incubadas em atmosfera enriquecida umidificada contendo 5% de CO ₂ a 37° C.....	51
Figura 8 – Micrografias da célula RKO AS45-1 nos hidrogéis GelMA NB e GelMA NA RKO em 24 e 48 horas, obtidas ao microscópio óptico (MO), pela marcação LIVE DEAD e pelo corte histológico(60x) com coloração por hematoxilina eosina (HE).....	53
Figura 9 – Imagens MEV (2000X) de células RKO AS45-1 apresentadas da seção transversal dos hidrogéis.....	54

Figura 10 – Esquema de preparação de hidrogéis híbridos com mantas de nanofibras: (A) mantas de nanofibras PCL eletrofiadas contendo pré-GelMA (grupos metacrilato); (B) hidrogel GelMA com pilhas de mantas de nanofibras eletrofiadas impregnadas com GelMA; (C) hidrogel GelMA com pedaços de nanofibras eletrofiadas.....	61
Figura 11 – Representação das pilhas de mantas eletrofiadas pré-impregnadas com pré-GelMA: I: A- Reação de fotopolimerização do GelMA com altos níveis de integração interfacial entre as nanofibras e a matriz de hidrogel. II: Representação de hidrogéis GelMA com duas (A) e quatro (B) mantas de nanofibras impregnadas (GelMA_2 * nanofibra e GelMA_4 * nanofibra).....	65
Figura 12 – Imagens MEV de nanofibras eletrofiadas G25P75 (A) e G50P50 (B) e seus respectivos histogramas representando os diâmetros das fibras; (C) porosidade do hidrogel GelMA revelada por MEV (300x); (D) porosidade da blenda GelMA com mantas picadas de nanofibras G25P75, revelada por MEV (300x e 5000x); (E) porosidade da blenda GelMA com mantas picadas de nanofibras G50P50, revelada por MEV (300x e 5000x).....	71
Figura 13 – Pilhas de mantas de nanofibras eletrofiadas G25P75 e G50P50 em hidrogéis GelMA, reveladas por microscopia eletrônica de varredura (A, B, C e D) e por μ -cT (E, F, G e H).....	73
Figura 14 – Espectros FTIR para as mantas de nanofibras (G25P75 e G50P50) e hidrogel GelMA e PCL. (B) Espectros dos hidrogéis com pilhas de mantas de nanofibras (G25P75 e G50P50). (C) Espectros de hidrogéis híbridos derivados de uma mistura de mantas picadas de nanofibras eletrofiadas e GelMA.....	75
Figura 15 – Curvas DSC para os hidrogéis híbridos GelMA_2 * G25P75, GelMA_4 * G25P75, GelMA_2 * G50P50 e GelMA_4 * contendo mantas de nanofibras empilhadas.....	77
Figura 16 – Comparação do inchamento dos hidrogéis GelMA, GelMA_2 * G25P75, GelMA_4 * G25P75, GelMA_2 * G50P50 e GelMA_4 * G50P50 após 24 horas de imersão em água (A) e o comportamento de degradação desses hidrogéis (B). Fotos de amostras de hidrogéis híbridos intumescidos (C).....	78
Figura 17 – Hidrogéis híbridos (GelMA_2 * G25P75) durante o ensaio mecânico (A). Curvas de tensão-deformação de hidrogéis GelMA_2 * G25P75, GelMA * 4_G25P75,	

GeIMA_2 * G50P50, GeIMA_4 * G50P50 (B). Resistência à tração obtida a partir das curvas tensão-deformação (C).....80

Figura 18 – Resultados de viabilidade celular MTT (A) e imagens MEV (2000X) de células RKO embutidas em hidrogéis (seção transversal das amostras de hidrogel) (B).....81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Códigos usados para descrição dos hidrogéis GeIMA.....	34
Tabela 2 – Valores médios dos diâmetros de poros e porosidade dos hidrogéis GeIMA por MEV e análise μ -cT.....	40
Tabela 3 – Composição das soluções submetidas à eletrofiação e parâmetros associados ao processo.....	63

SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM Microscopia de força atômica

AM Anidrido metacrílico

CM Controle de morte

CMC Celulose microcristalina

CV Controle de vida

DI Água deionizada

DMEM Minimal Essential Medium, meio de cultura utilizado pela maioria das células

DTG Termogravimetria derivada

ECM Matriz extracelular

FI Foto iniciador

FT-IR Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier

FUNED Fundação Ezequiel Dias

GelMA Gelatina Metacrilóil

GI Grau de intumescimento

GO Óxido de grafeno

HE Coloração por hematoxilina eosina

I-AFM Microscopia de força atômica condutiva

IARC Agência internacional de pesquisa sobre o câncer

ICB Instituto de ciências biológicas

ID Índice de degradação

MET Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV Microscopia Eletrônica de Varredura

MO Microscópio óptico

NA Nível alto metacrilção

NB Nível baixo metacrilção

NCC Nanocristais celulose

PCL Policaprolactona

RENAMA Rede nacional de métodos alternativos

RKO Linhagens de células tumorais do cólon humano

SFB Soro fetal bovino

UV Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Uso de animais em experimentação	17
1.2 Dispositivo 3D	18
1.2.1 Organoides	19
1.2.2 Organoides tumorais	20
1.3 Hidrogéis	21
1.3.1 Hidrogel GelMA	23
1.3.2 Hidrogéis híbridos	24
1.4 Roteiro do documento da Tese	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos por capítulo	27
3 AJUSTE DAS ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE HIDROGÉIS DE GELATINA METACRILÓIL FOTOPOLIMERIZÁVEIS APRIMORADAS PARA FORMAÇÃO DE ORGANOIDES TUMORAIS	29
3.1 Introdução	30
3.2 Materiais e métodos	32
3.2.1 Materiais	32
3.2.2 Preparo Pré-GelMA	33
3.2.3 Preparo GelMA	33
3.2.4 Preparo GelMA_NCC e GelMA_rGO	34
3.2.5 Caracterização	35
3.2.5.1 <i>Morfologia</i>	35
3.2.5.2 <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	35
3.2.5.3 <i>Intumescimento</i>	35
3.2.5.4 <i>Comportamento dinâmico – mecânico</i>	36

3.2.5.5 <i>Microscopia de força atômica (AFM) – nanoindentação</i>	36
3.2.6 Ensaio biológico.....	37
3.2.6.1 <i>Cultura de células</i>	37
3.2.6.2 <i>Polimerização e encapsulamento celular</i>	38
3.2.7 Ensaio de citotoxicidade	38
3.2.7.1 <i>Análise de viabilidade celular por MTT</i>	38
3.2.7.2 <i>Viabilidade por LIVE DEAD</i>	39
3.2.8 Caracterização Celular.....	39
3.2.8.1 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	39
3.2.8.2 <i>Corte histológico</i>	39
3.3 Resultado e discussão	40
3.3.1 Textura de poros	40
3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	42
3.3.3 Características de intumescimento	44
3.3.4 Propriedades mecânicas	47
3.3.5 Citotoxicidade.....	50
3.4 Conclusões	56
4 HIDROGÉIS BASEADOS EM BIOMACROMOLÉCULAS CONTENDO NANOFIBRAS ELETROFIADAS COM PROPRIEDADES E BIOATIVIDADE APRIMORADAS	58
4.1 Introdução	59
4.2 Materiais e métodos	62
4.2.1 Materiais.....	62
4.2.2 Preparo Pré-GelMA.....	62
4.2.3 Preparo de hidrogéis GelMA.....	62
4.2.4 Preparo nanofibras GelMA / PCL.....	63
4.2.5 Preparação de hidrogéis GelMA contendo nanofibras eletrofiadas	63

4.2.6 Hidrogéis híbridos derivados de uma mistura de nanofibras eletrofiadas e GelMA	64
4.2.7 Preparação de uma pilha de nanofibras eletrofiadas impregnadas com pré-GelMA	64
4.2.8 Caracterização e determinação de propriedades.....	65
4.2.8.1 <i>Morfologia</i>	66
4.2.8.2 <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	66
4.2.8.3 <i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	66
4.2.8.4 <i>Intumescimento</i>	66
4.2.8.5 <i>Testes de tração</i>	67
4.2.8.6 <i>Cultura de células in vitro</i>	67
4.2.8.7 <i>Encapsulamento RKO AS45-1 em mistura fotopolimerizável de mantas de nanofibras eletrofiadas e GelMA</i>	68
4.2.8.8 <i>Polimerização e encapsulamento celular</i>	68
4.2.9 Caracterização de células	69
4.2.9.1 <i>Análise da viabilidade celular por MTT de hidrogéis preparados pela mistura de pedaços de mantas de nanofibras eletrofiadas e GelMA</i>	69
4.2.9.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	69
4.3 Resultado e discussão	70
4.3.1 <i>Morfologia de nanofibras eletrofiadas e hidrogéis contendo pedaços de mantas de nanofibras eletrofiadas</i>	70
4.3.2 <i>Estrutura química de nanofibras e GelMA</i>	74
4.3.3 <i>Estudo DSC de nanofibras e hidrogéis híbridos</i>	77
4.3.4 <i>Comportamento de intumescimento e degradação dos hidrogéis híbridos</i>	78
4.3.5 <i>Propriedades mecânicas do hidrogel híbrido</i>	79
4.3.6 <i>Viabilidade celular</i>	81
4.4 Conclusões	82
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

5.1 Conclusões gerais	84
5.2 Sugestões para trabalhos futuros	84
REFERÊNCIAS.....	85
Apêndice A.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de animais em experimentação

O uso de animais em pesquisas contribuiu para a humanidade em muitas áreas importantes, incluindo pesquisa de doenças, desenvolvimento de novos medicamentos e testes de segurança. O estudo de rotina de animais tornou-se essencial na ciência, a fim de compreender os conceitos básicos de anatomia e fisiologia e de compreender o corpo saudável e o corpo enfermo.¹

O uso generalizado de animais trouxe à tona a questão do possível sofrimento destes durante os experimentos e como isso supera os potenciais benefícios da pesquisa com animais. Na maioria dos países, regulamentos rígidos governam o uso de animais, garantindo que estes sejam usados apenas quando necessário, sendo devidamente manipulados antes, durante e após experimentos.²

No livro *The Principles of Human Experimental Technique*, publicado pela primeira vez em 1959, os autores propuseram o conceito dos três “Rs” para utilização dos animais. Essa proposta não impede a utilização de modelos animais em experimentação, mas visa uma adequação e reflexão de humanizá-la tendo em vista o sofrimento animal.²

O Princípio dos 3Rs é assim denominado em função das iniciais, em inglês, (Replacement, Reduction and Refinement).¹

A substituição está relacionada com tecnologias ou métodos que substituem ou diminuem uso de animais pelos testes *in vitro*. Os animais de pesquisa são utilizados para responder a questões científicas, incluindo as relacionadas à saúde humana. Os modelos de animais na maioria das vezes são onerosos e demorados e, dependendo da questão de pesquisa, apresentam limitações científicas, como a relevância da biologia humana.³

A redução refere-se a alternativas que diminuam o número de animais utilizados por experiência ou estudo com objetivos científicos. A redução também inclui alternativas para diminuir o uso de animais adicionais, ou seja, possibilita que as informações coletadas por animal em uma experiência sejam maximizadas. É importante garantir que a redução do número de animais utilizados seja equilibrada para evitar sofrimento adicional que possa ser causado pelo uso repetido.⁴

Refinamento refere-se as técnicas de criação e de experimentação que minimizam o sofrimento, a dor, ou danos duradouros que podem ser vivenciados por animais de pesquisa e que melhoram seu bem-estar. O refinamento se refere desde a habitação e criação dos animais até os procedimentos científicos realizados neles. O refinamento possibilita o uso de anestesia e analgesia adequadas para minimizar a dor e treinamento de animais para cooperar com procedimentos para minimizar qualquer dificuldade.^{5,6}

Ao longo dos últimos 40 anos, os 3Rs se tornaram princípios éticos amplamente aceitos e agora são incorporados na condução de estudos baseados em animais em muitos países do mundo.¹

Várias metodologias têm sido utilizadas como alternativas que não utilizam animais como modelo experimental. O que tem sido realizado com grande sucesso é a utilização de métodos alternativos *in vitro* para refinar testes futuros *in vivo* com redução de número de animais. Os métodos alternativos podem ser adotados como ferramentas complementares aos testes *in vivo*, onde ambos em conjunto, se tornarão ferramentas indispensáveis para a compreensão do comportamento de substâncias no organismo humano, dos mecanismos de ação para a análise de riscos e estabelecimento de limites considerados seguros.⁷

1.2 Dispositivo 3D

As culturas de células foram comprovadamente indispensáveis para uma variedade de aplicações, desde a pesquisa até as perspectivas industriais. O cultivo de células é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas (*in vitro*) em laboratório independente do organismo que as originou.⁶

Os ensaios baseados em células são amplamente utilizados. Os sistemas de cultura 2D convencionais ajudaram a entender a complexa fisiologia celular sobre como as células funcionam e respondem aos estímulos, porém, as culturas bidimensionais (2D) de célula sofrem desvantagens associadas à perda de arquitetura específica de tecido, sugestões mecânicas e bioquímicas e interações entre células e entre células a matriz.^{6,8}

As culturas de células tridimensionais (3D) possibilitam níveis de diferenciação de células e organização de tecido não possíveis em sistemas convencionais de cultura bidimensional (2D).^{8,9}

Os avanços recentes em biologia celular e engenharia de tecidos possibilitaram o desenvolvimento de uma ampla gama de tecnologias de cultura celular 3D. Os modelos de cultura 3D provaram ser mais realistas para traduzir os achados do estudo para aplicações *in vivo*. Enquanto as linhas celulares nos fornecem um excelente material de estudo homogêneo, cultivar como modelos 3D, induzir a comportar-se de uma maneira, é um passo mais próximo das condições naturais.⁹

Modelo tridimensional oferecem estruturas biologicamente superiores que podem ser utilizadas para estudar interações complexas que não eram possíveis com culturas 2D. As culturas em 3D podem ser utilizadas eficientemente para compreender estudos complexos para pesquisas básicas e aplicadas. Os avanços dinâmicos na tecnologia de instrumentação e nas ciências dos materiais permitiram o aumento da complexidade das técnicas de cultura celular. As culturas de células 3D têm uma infinidade de aplicações; para descoberta de drogas, estudos farmacológicos, compreensão de fisiologia celular, expressões de genes e proteínas, pesquisa de câncer, engenharia de tecidos e também para aumentar a produtividade da indústria de biotecnologia.¹⁰

1.2.1 Organoides

Nos últimos anos, um modelo alternativo *in vitro* 3D para tecidos humanos, denominado organoides, tem sido desenvolvido. As células-tronco adultas são preparadas a partir de tecidos humanos ou de ratos e incorporados em uma matriz tridimensional onde se auto organizam em estruturas epiteliais que se assemelham ao respectivo órgão de origem. As tecnologias celulares são promissoras para desenvolvimentos de culturas tridimensionais (3D) dos organoides, para uma variedade de estruturas, tanto *in vitro* como *in vivo*.¹¹

A definição básica dos organoides implica em várias características importantes: deve conter mais do que um tipo de célula do órgão que ele modela, deve exibir alguma função específica para esse órgão, e as células devem ser organizadas

de forma semelhante ao próprio órgão. Isso também implica semelhança em relação a como o órgão estabelece sua organização durante o desenvolvimento.¹²

Assim, um organoide pode ser derivado de vários tipos de células que se desenvolvem a partir de células-tronco pluripotentes humanas ou de órgãos progenitores, podendo se auto organizar por meio da classificação celular e linhagem semelhante ao processo *in vivo*.¹²

Organoides podem ser usados para reproduzir um órgão, modelar uma doença pela introdução de mutações de células pluripotentes derivadas do paciente ou mesmo em aplicações como testes de drogas e terapia de reposição de tecido.¹³

A células-tronco pluripotentes humanas podem gerar organoides intestinais, renais, cerebrais, retinianos, de fígado, entre outros. Os métodos de derivação são específicos para cada um desses sistemas, com foco na recapitulação de processos de desenvolvimento endógenos. Essas estruturas complexas proporcionam uma oportunidade única para modelar o desenvolvimento de órgãos humanos em um sistema notavelmente similar ao desenvolvimento *in vivo*.¹³

Além disso, os organoides que modelam a doença podem ser usados como um sistema alternativo para o teste de drogas que pode não só melhorar os efeitos de recapitulação em pacientes humanos, mas também pode reduzir os estudos em animais.

1.2.2 Organoides tumorais

O câncer é uma das grandes causas de mortes em todo o mundo. Com o aumento do envelhecimento da população, o câncer global deve aumentar para 27,5 milhões de novos casos e 16 milhões de mortes até 2040, de acordo com um recente relatório da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC). Em 2018 houve 17,0 milhões de novos casos de câncer e 9,5 milhões de mortes por câncer em todo o mundo.¹⁴ Embora um progresso substancial tenha sido feito em estratégias de tratamento anticâncer padrão, um tratamento eficaz ainda está faltando principalmente devido à heterogeneidade do tumor entre os pacientes. A heterogeneidade do tumor resulta em diferenças significativas na taxa de crescimento deste, sua capacidade de invasão, sensibilidade à droga e prognóstico entre pacientes individuais.¹⁵ Portanto, o desenvolvimento de um organoide tumoral de alta fidelidade

em sistema tridimensional é urgentemente necessário para fornecer informações precisas sobre os padrões de evolução molecular relacionados ao câncer na pesquisa básica e para permitir anticancerígenos personalizados em terapia clínica.

O hidrogel se mostra com grande potencial para aplicação *in vitro* visando a obtenção de agregados 3D para uma variedade de tipos de células, sendo capaz de estimular ou imitar as funções complexas do tecido vivo.^{16,17} Ou seja, tal material seria capaz de reproduzir *in vitro* os tecidos e fornecer o microambiente celular essencial para controlar a formação de tecidos funcionais e interações dinâmicas entre as matrizes circundantes e as células.¹

1.3 Hidrogéis

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos reticulados, capazes de reter grandes quantidades de água em uma estrutura intumescida. Esses materiais quando intumescidos são "macios" e exibem um comportamento que é governado pela estrutura e arquitetura do polímero. Embora o teor de polímero possa variar bastante, normalmente um gel contém de 0,1 a 10% em peso de polímero. Isso faz com que o hidrogel seja altamente poroso, permitindo a difusão de nutrientes, oxigênio e biomoléculas, além de permitir a troca de metabólitos e toxinas para longe das células. A porosidade favorece a infiltração e interconectividade celular, possibilitando um excelente meio de crescimento para os tecidos.¹⁸ Porém, géis com poros de diâmetro inferior a 10 μm podem limitar a difusão celular. A reticulação também determina a capacidade do gel de resistir à expansão e manter a estrutura, contribuindo assim para a quantidade de água que um gel pode absorver (grau de expansão) modulando suas propriedades mecânicas.¹²

Os hidrogéis são redes hidrofílicas homopoliméricas ou copoliméricas, em configuração tridimensional (3D) e quimicamente ou fisicamente reticulados, conhecidos pela sua grande capacidade de absorção de água.^{19,20} A sua afinidade para absorver a água é atribuída à presença de grupos hidrofílicos, tais como -OH, CONH, -CONH₂, e -SO₃H. Devido à contribuição dos grupos funcionais, o gel se hidrata em diferentes graus, por vezes, mais do que 90% em massa.¹⁹

O conteúdo aquoso de um hidrogel determina as suas características físico-químicas, já que ele está diretamente relacionado à presença dos grupos funcionais

na estrutura. Além disso, as propriedades físicas dos hidrogéis são muito semelhantes aos tecidos vivos, pois estes apresentam consistência macia e baixa tensão interfacial com água ou fluidos biológicos.¹⁹

Os hidrogéis são uma classe de materiais comumente utilizada em aplicações biomédicas e biotecnológicas. Sua semelhança estrutural com a matriz extracelular encontrada *in vivo* os torna um excelente substrato para aplicações de cultura de células. Além disso, seu alto teor de água e biocompatibilidade permitem o cultivo de células vivas dentro da estrutura da rede polimérica, que pode ser facilmente moldada e estruturada em várias geometrias.²⁰

Além dessas características, por ser atóxico, apresentar consistência elastomérica, o que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel, alta permeabilidade, o que permite o fluxo de fluídos corpóreos pelo hidrogel devido à alta porosidade, facilidade de obtenção em diferentes formas e possibilidade de incorporação e liberação controlada de fármacos de diferentes polaridades, são interessantes para aplicação biomédica.²⁰

Os hidrogéis podem ser projetados para favorecer a proliferação, migração e diferenciação celular, permitir o transporte de oxigênio e nutrientes, e fornecer às células um ambiente 3D altamente hidratado que imita os tecidos moles nativos.¹²

Atualmente tem-se observado um interesse crescente em hidrogéis preparados a partir de polissacarídeos. Cada classe de material apresenta vantagens e desvantagens. No entanto, os polímeros naturais normalmente possuem biocompatibilidade e capacidades bio-instrutivas aprimoradas, com algumas exibindo um comportamento de rigidez de tensão que mais se assemelha à matriz extracelular nativa. Os polímeros sintéticos, por outro lado, oferecem propriedades químicas mais previsíveis, precisas e versáteis comparados aos hidrogéis.¹² Estes polímeros são, abundantes, obtidos a partir de fontes renováveis, apresentam baixo custo de produção além de diversas composições e propriedades, o que permite sintetizar diversas estruturas químicas. Dentre os polissacarídeos mais utilizados para este fim está a gelatina de metacrilato.²¹

Hidrogéis baseados em polímeros naturais ou sintéticos têm sido utilizados como biomateriais em diversas aplicações, como na engenharia de tecidos, regeneração e reparação de órgãos e em sistemas de liberação controlada de fármacos em locais específicos do corpo e em scaffold 3D.^{20,21}

1.3.1 Hidrogel GelMA

As propriedades físicas e químicas de superfície são extremamente importantes para a cultura de células. A gelatina é um polipeptídeo, obtida por meio da hidrólise parcial e desnaturação do colágeno, o que possibilita a adesão celular.²² A gelatina é, portanto, um polímero natural atraente para a obtenção de hidrogéis com alta biocompatibilidade.

A gelatina, além de solúvel em água, é biodegradável e pode ser quimicamente modificada. As aplicações biomédicas são amplas, principalmente no setor de medicamentos e da Engenharia de tecidos.²³

Uma modificação usada para reticulação química da gelatina é a inserção de grupos metacrilamida aos grupos amino da lisina, resultando em gelatina metacrilamida.²⁴

Realiza-se a reticulação da gelatina metacrilamida por polimerização radicalar dos grupos metacrilamida, resultando em hidrogéis. A estabilidade mecânica destes hidrogéis é superior à estabilidade mecânica de hidrogéis físicos de gelatina não modificada. Além disso, as propriedades mecânicas dos hidrogéis de gelatina metacrilamida podem ser manipuladas em uma ampla gama ajustando o grau de modificação de metacrilamida.²²

O hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA), também conhecido como gelatina metacrilato, gelatina metacrilada ou gelatina metacrilamida, é um hidrogel utilizado em aplicações de biofabricação devido à sua eficácia, baixo custo, facilidade de síntese e biocompatibilidade para permitir a adesão celular e proliferação.²⁵

A polimerização da GelMA pode ser iniciada por radiação sob exposição à luz UV, na presença de um fotoiniciador, para formar hidrogéis covalentemente reticulados. Esta polimerização pode ocorrer em condições amenas (temperatura ambiente, pH neutro, em ambientes aquosos, etc.) Isso permite que a microfabricação dos hidrogéis possua padrões únicos, morfologias e estruturas 3D, favorecendo plataformas ideais para controlar comportamentos celulares e as interações de biomateriais celulares.^{26,27}

A síntese do GelMA ocorre entre gelatina e anidrido metacrílico entre os grupos amina primária e hidroxilas. O anidrido metacrílico reage com os grupos amina primária resultante da adição de grupos metacrilato nos macrômeros da gelatina.²⁸ A reticulação do GelMA acontece quando o GelMA, na presença de um fotoiniciador, é

exposto à radiação da luz UV. Após a absorção da luz UV, os radicais livres são formados, e o GelMA é então polimerizado.²⁹

Dessa forma, o hidrogéis GelMA são adequados como suporte em cultura celular em dispositivos 3D. Para se reproduzir tecidos semelhantes aos vivos, um dos requisitos essenciais é gerar montagens organizadas de vários tipos de células para assemelhar-se às arquiteturas complexas dos tecidos direcionados *in vitro*.

1.3.2 Hidrogéis híbridos

Os hidrogéis híbridos são construídos a partir de misturas de diferentes componentes, que são selecionados por possuir propriedades específicas. Embora o GelMA seja um material responsivo às células com amplo espectro de propriedades sintonizáveis, design personalizado de materiais híbridos é uma ótima estratégia para melhorar algumas características do GelMA para determinadas aplicações, como por exemplo melhorar e favorecer a proliferação celular e propriedades mecânicas do hidrogel, como no caso do uso do óxido de grafeno, dos nanocristais de celulose, e incorporação de nanofibras de policaprolactona (PCL).

O óxido de grafeno (GO) é usado como aditivo que visa melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis GelMA. Shin et al. demonstraram que o híbrido GelMA-GO facilita o espalhamento e o alinhamento das células e melhora a viabilidade e proliferação em microambientes 3D, provavelmente devido às interações entre células e as nanoestruturas do GO dentro do hidrogel.³⁰ O GO em hidrogéis GelMA não só melhora suas propriedades mecânicas, mas também aumenta a condutividade elétrica dos hidrogéis híbridos resultantes, permitindo uma estratégia simples para produzir dispositivo para estudos de cultura celular *in vitro*.³¹

Os nanocristais de celulose (NCC), também conhecidos como whiskers, cristalitos ou cristais de celulose, são constituídos de domínios cristalinos de celulose que apresentam diferentes propriedades mecânicas, óticas, magnéticas e térmicas. Existe uma grande expectativa com relação à utilização dessas nanoestruturas no desenvolvimento de materiais avançados relacionados a hidrogéis, filmes finos e dispositivos óticos. Isso se justifica pelo fato de serem de fácil obtenção e por apresentarem excelentes propriedades mecânicas, associadas a uma baixa

densidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e possibilidade de funcionalização química devido à presença de hidroxilas superficiais.^{31,32}

A adição dos NCC nos hidrogéis promove uma significativa melhora das propriedades mecânicas do material atribuída à formação de uma rede rígida e contínua das nanopartículas. Isso é resultante das fortes interações intermoleculares entre os NCC, e devido às pequenas distâncias entre as partículas, por serem orientadas por um mecanismo de percolação.³¹

Nanofibras de policaprolactona (PCL) tem sido utilizada em inúmeras aplicações biomédicas devido às suas excelentes qualidades como solubilidade em diversos solventes orgânicos comuns e a capacidade de ser processada a baixas temperaturas. A vantagem de usar a PCL é devido a sua bioestabilidade, biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas apresentadas por este polímero. Seu processamento é realizado a partir da técnica de electrospinning, que permite sintetizar matrizes fibrosas com uma elevada área superficial compostas por fibras ultrafinas. Estas propriedades contribuem para uma melhor adesão, proliferação, migração e diferenciação celular.³³

1.4 Roteiro do documento da Tese

A Introdução é apresentada no Capítulo 1, com foco na estrutura e propriedades dos hidrogéis e organoides. O Capítulo 2 apresenta os objetivos gerais do trabalho, assim como os objetivos específicos de cada capítulo apresentada na Tese de Doutorado.

Os Capítulos 3 e 4 apresentam os resultados obtidos durante a execução desse trabalho. Eles foram descritos na forma de artigos, e divididos de acordo com os seus objetivos específicos. Cada capítulo é independente, e por esse motivo tornou-se necessário a repetição de algumas metodologias e definições presentes em outros capítulos. Além disso, diferentes metodologias e equipamentos podem ter sido utilizados para análise similares em cada capítulo, já que o trabalho foi realizado parcialmente na Escola de Engenharia (UFMG), na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e no Instituto de Ciências Biológicas (ICB, UFMG).

O Capítulo 3 descreve a mudança da estrutura dos hidrogéis com diferentes níveis de metacrilção, incorporação de nanocristal de celulose e óxido de grafeno

reduzido, e incorporação de células ao sistema como possibilidade de formação de um organoide tumoral.

O 0descreve dois métodos de incorporação de nanofibras nos hidrogéis favorecendo a incorporação de células ao sistema tridimensional bem como a melhora da propriedade mecânica.

E por fim, as considerações finais sobre este trabalho de doutorado são apresentadas no 0, assim como sugestões para trabalhos futuros e publicações relacionadas a este trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar hidrogéis de gelatina metacrilóil como alternativa de organoide tumoral e hidrogéis baseados em biomacromoléculas contendo nanofibras por eletrofiação.

2.2 Objetivos Específicos por capítulo

Capítulo 3:

- ✓ Sintetizar o hidrogel GelMA em diferentes níveis de metacrilatação, nível baixo (NB) e nível alto (NA) como possibilidade de um organoide tumoral;
- ✓ Modificar a estrutura do GelMA com a incorporação de nanocristal de celulose e óxido de grafeno reduzido;
- ✓ Caracterizar morfologicamente e físico-quimicamente as estruturas;
- ✓ Incorporar a linhagem celular RKO AS45-1 nos hidrogéis;
- ✓ Avaliar os efeitos citotóxicos dos hidrogéis sobre a linhagem RKO AS45-1;
- ✓ Verificar a adesão e proliferação celular nos hidrogéis;
- ✓ Realizar corte histológica dos hidrogéis com as células incorporadas.

Capítulo 4:

- ✓ Sintetizar o hidrogel GelMA;
- ✓ Modificar a estrutura do hidrogel GelMA com duas variações de nanofibras de PCL/GelMA a partir da eletrofiação: nanofibra G25P75 e G50P50;
- ✓ Incorporar as nanofibras por dois métodos distintos: pedaços de nanofibras cortadas e misturadas ao sistema e eletrofiação das nanofibras em camadas com os hidrogéis;
- ✓ Caracterizar morfologicamente e físico-quimicamente as estruturas;
- ✓ Incorporar a linhagem celular RKO AS45-1 nos hidrogéis GelMA contendo as nanofibras cortadas;

- ✓ Verificar os efeitos citotóxicos dos hidrogéis sobre a linhagem RKO AS45-1;
- ✓ Verificar a possibilidade dos hidrogéis híbridos encapsularem as células.

3 AJUSTE DAS ESTRUTURAS E PROPRIEDADES DE HIDROGÉIS DE GELATINA METACRILÓIL FOTOPOLIMERIZÁVEIS APRIMORADAS PARA FORMAÇÃO DE ORGANÓIDES TUMORAIS

Resumo: Organóides tumorais têm grande potencial como um sistema tridimensional *in vitro* para modelar o desenvolvimento e tratamento do câncer. Neste trabalho, estudamos como a estrutura de hidrogéis à base de gelatina enxertada com grupos metacrilóil fotopolimerizáveis (GelMA) pode afetar o uso desta promissora matriz extracelular artificial em organóides tumorais. Para tanto, hidrogéis de gelatina com diferentes níveis de metacrililação (níveis baixos (NB) e níveis altos (NA)) e com a incorporação de nanocristais de celulose (NCC) e óxido de grafeno reduzido (rGO) foram preparados e utilizados para encapsular linhagem celular de carcinoma de cólon humano (RKO AS45-1). A morfologia dos hidrogéis liofilizados, investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microtomografia de raios-X, mostrou que a porosidade foi reduzida para hidrogéis com maiores densidades de reticulação e que GelMA com nanocomponentes tendeu a ter tamanhos de poros menores. A capacidade de intumescimento do GelMA em água mostrou que os hidrogéis com maiores níveis de metacrililação foram mais estáveis em relação à degradação / dissolução. As propriedades mecânicas do GelMA foram medidas em condições dinâmicas a 37° C, imergindo as amostras em água e submetendo-as a cargas de compressão dinâmica. Os resultados mostraram que a presença de NCC foi capaz de fornecer estabilidade mecânica aos hidrogéis em frequências mais altas. Células da linhagem RKO AS45-1 incorporadas ao GelMA foram capazes de proliferar dentro dos hidrogéis, levando à formação de grupos de células em todo o material 48 horas de cultivo. GelMA com maiores densidades de reticulação e NCC tenderam a mostrar maior população de células como uma possível consequência do maior nível de estabilidade e rigidez exibida por esses hidrogéis. Os resultados gerais revelaram que os hidrogéis à base de gelatina polimerizáveis são candidatos poderosos para hospedar organóides tumorais.

3.1 Introdução

As culturas de células foram e continuam sendo indispensáveis para uma variedade de aplicações, desde a pesquisa até as perspectivas industriais. Diferentes aplicações têm sido desenvolvidas usando linhagens celulares, tais como: estudos farmacológicos, descoberta de medicamentos, compreensão da fisiologia celular, expressão de genes e proteínas, pesquisa em câncer, engenharia de tecidos e também para aumentar a produtividade da indústria de biotecnologia têm sido desenvolvidas.¹⁰

A cultura de células é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas (*in vitro*) em laboratório independente do organismo que as originou.⁶

Os sistemas convencionais de cultura de células bidimensionais (2D) ajudaram a compreender a complexa fisiologia celular de como as células funcionam e respondem aos estímulos. No entanto, as culturas de células 2D apresentam desvantagens associadas à perda de arquitetura de tecido específico, propriedades mecânicas e bioquímicas e interações células -célula e célula-matriz.^{8, 10}

Avanços significativos na biologia celular e ciência dos materiais permitiram o desenvolvimento de modelos de cultura 3D que provaram ser mais realistas, oferecendo estruturas biologicamente superiores que podem ser usadas para estudar interações complexas que não eram possíveis com culturas 2D^{9, 10} o que levará a diagnósticos e terapias mais sofisticados.

Nos últimos anos, um modelo alternativo 3D *in vitro* para tecidos humanos, denominado organoides, foi desenvolvido. Um organoide pode ser derivado de vários tipos de células que se desenvolvem a partir de células-tronco pluripotentes humanas ou órgãos parentais, e se organiza por meio de classificação celular e linhagem semelhante ao processo *in vivo*, de fluidos, forças de fatores mecânicos e bioquímicos.^{34, 35} Eles podem ser usados para reproduzir um órgão ou modelar uma doença, introduzindo mutações da doença ou usando células pluripotentes derivadas do paciente para permitir testes de drogas e terapias de substituição de tecidos.¹³

Organoides cancerosos podem ser desenvolvidos a partir de pacientes com vários graus e subtipos de câncer. Organoides derivados de pacientes podem ter antecedentes genéticos, enquanto organoides normais podem ser usados para modelar a evolução do câncer após a inserção de mutações oncogênicas.¹³ O comportamento de cepas de câncer em organoides tumorais pode ser monitorado em

tempo real a partir de imagens microscópicas, assim como linhagens celulares, que podem ser expandidas e preservadas para estabelecer um biobanco vivo de organoides.³⁶

Avanços significativos em biomateriais, especialmente hidrogéis, têm oferecido oportunidades para facilitar o desenvolvimento de sistemas 3D que podem ser usados em promissores organoides minitumorais.³⁷

Os hidrogéis são uma classe de materiais comumente usados em aplicações biomédicas e biotecnológicas. Sua similaridade estrutural com a matriz extracelular encontrada *in vivo* os torna um excelente substrato para aplicações em cultura de células. Além disso, seu alto teor de água e biocompatibilidade permitem o cultivo de células vivas dentro da estrutura da rede polimérica, que pode ser facilmente moldada e estruturada em várias geometrias.²⁷

Além disso, não toxicidade dos hidrogéis, sua consistência elastomérica (que minimiza o atrito entre os tecidos e o hidrogel), alta permeabilidade (que permite o fluxo de fluidos corporais, oxigênio e nutrientes através do hidrogel) e a possibilidade de prepará-lo em diferentes formas com a incorporação e liberação controlada de drogas de diferentes polaridades são interessantes para aplicações biomédicas.²⁷

Os hidrogéis podem ser projetados para favorecer a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular e fornecer às células um ambiente 3D altamente hidratado que imita os tecidos moles naturais.³⁵

Assim, a estrutura tridimensional dos hidrogéis juntamente com o encapsulamento de células para mediar as principais funções como biocompatibilidade, migração, adesão e proliferação, tem grande potencial como alternativa aos organoides tumorais como um sistema eficaz de câncer para estudar os mecanismos de ação e inibição da invasão tumoral.³⁸

O hidrogel de gelatina metacrilato (GelMA), também conhecido como gelatina metacrilada, vem sendo testado devido à sua facilidade de síntese e sua biocompatibilidade que permite a adesão e proliferação celular.²⁵

A polimerização do GelMA pode ser iniciada por radiação sob exposição à luz ultravioleta, na presença de um fotoiniciador, para formar hidrogéis reticulados. Esta polimerização pode ocorrer em condições amenas (temperatura ambiente, pH neutro, em ambientes aquosos, etc.). Isso permite que a microfabricação de hidrogel tenha padrões, morfologias e estruturas 3D únicas, favorecendo plataformas ideais para controlar o comportamento celular e as interações entre células e biomateriais.^{26,27,29}

Apesar das notáveis conquistas e avanços tecnológicos da última década, desenvolver uma estrutura tridimensional com aplicação celular eficiente ainda é uma tarefa difícil.³⁹ Numerosas abordagens foram desenvolvidas e testadas nas quais frequentemente apresentam estratégias não escalonáveis e, às vezes, condições 3D mais semelhantes à cultura de células 2D.

Biomateriais baseados em GelMA continuarão a ser usados como uma alternativa promissora em diversas aplicações biomédicas que ainda precisam ser exploradas. Junto com seu uso como modelos organoides, eles têm uma tendência de alcançar modelos para tratamento de câncer mais abrangentes que produzem benefícios reais de tratamentos anticâncer personalizados para os pacientes.³⁸

Assim, neste trabalho, o objetivo foi buscar o desenvolvimento de organoides tumorais em uma matriz tridimensional de gelatina metacrilóil (GelMA). A estrutura e as propriedades do GelMA foram ajustadas variando-se a densidade de reticulação e pela incorporação de nanocomponentes, como nanocristais de celulose (NCC) e óxido de grafeno reduzido (rGO), para verificar a capacidade desta matriz extracelular artificial de suportar o crescimento de linhagens de células de carcinoma do cólon humano (RKO AS45-1).

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais

Gelatina de pele porcina Tipo A 300 Bloom (Sigma-Aldrich, G1890), anidrido metacrílico (Sigma-Aldrich, 276685), membrana para diálise Spectro / MWCO 12-14 kDa (Fisher Scientific), 2 -Hidroxi-4 ' - (2-hidroxiethoxi) -2-metilpropiophenone (Sigma-Aldrich, 410896-10G), Dulbecco's Modified Eagle's High (Life Technologies, 11320033), Soro fetal bovino (Gibco), Trypsina 0,25% (Gibco - Life Technologies), Penicilina Estreptomicina (Gibco - Life Technologies), LIVE / DEAD TM Viability / Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, 13224). Óxido de grafeno reduzido (CTNANO, UFMG).

3.2.2 Preparo Pré-GelMA

A síntese da gelatina metacrilóil foi realizada solubilizando 10 g de gelatina em 100 ml de PBS (pH 7,4) a 50° C. Em seguida, 4 g de AM ou 7 g de AM foram adicionados à solução de gelatina para produzir dois níveis diferentes de metacriliação: baixo (NB) e alto (NA), respectivamente. As soluções foram agitadas durante 2 horas a 50° C e dialisadas durante 5 dias em uma membrana porosa em água deionizada (DI), sob agitação, de forma a remover os subprodutos da reação, denominado ácido metacrílico e outras impurezas de baixa massa molar. A reação entre a gelatina e o anidrido está representada na Figura 1.

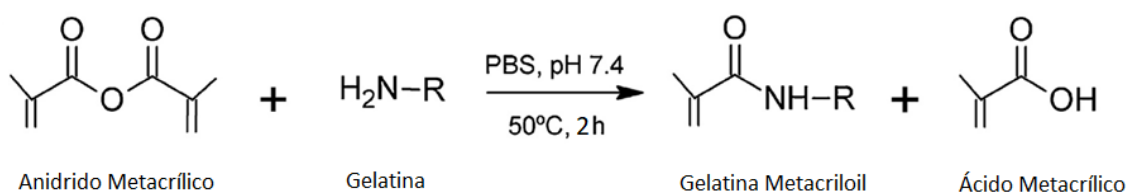


Figura 1: Esquema da reação da gelatina com o anidrido metacrílico

A diálise foi realizada a 50° C durante 5 dias, sob agitação, sendo a água trocada 2 vezes ao dia durante esse período. Após os 5 dias o pré-GelMA foi colocado em tubos falcons e congelados em aproximadamente -20° C e posteriormente transferidos para uma geladeira a -80° C por 24 horas antes da liofilização. Por fim, a liofilização do pré-GelMA foi realizada por 48 horas de forma a remover totalmente a água.

O pré-GelMA é assim chamado porque ainda não foi polimerizado.

3.2.3 Preparo GelMA

Para produzir GelMA, uma solução de 10 mg de 2-hidroxi-4'- (2-hidroxietoxi) - 2-metilpropilfenona (fotoiniciador) em 1 ml de água ultrapura e 100 mg de pré-GelMA liofilizado foi submetida à luz UV (comprimento de onda na faixa de 360-480 nm, 6,9 mW / cm²) por 10 minutos para fotopolimerização. A mesma quantidade de pré-GelMA

foi usada para os diferentes níveis de metacrilatação para preparar GelMA NB e GelMA NA (níveis baixos (NB) e níveis altos (NA)).

3.2.4 Preparo GelMA_NCC e GelMA_rGO

Os nanocristais de celulose (NCC) foram extraídos da polpa de eucaliptos branqueada, doada pela empresa Suzano Papel e Celulose. Para extração de NCC, 30 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 65% em peso) foram usados para cada 1 g de polpa. A hidrólise ácida foi conduzida a 40° C por 10 minutos sob agitação mecânica de 300 rpm. A suspensão obtida foi diluída em água e cubos de gelo para interromper a reação, filtrada, centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos e transferida para membranas de celulose D9402. A diálise foi realizada em água destilada até atingir pH neutro.

Para preparar o GelMA NCC, foram adicionados 10 mg do fotoiniciador e 100 mg do pré-GelMA liofilizado a 1 ml de água ultrapura. Então, 5 ou 10% em massa de NCC em relação à gelatina foram incorporados às soluções para produzir GelMA NB 5% NCC, GelMA NB 10% NCC, GelMA NA 5% NCC e GelMA NA 10% NCC.

Para preparar o GelMA rGO, foram adicionados 10 mg do fotoiniciador e 100 mg do pré-GelMA liofilizado a 1 ml de água ultrapura. Então 20% em massa de rGO foi disperso na solução pré-GelMA para produzir GelMA NB rGO e GelMA NA rGO após fotopolimerização.

Após a polimerização dos hidrogéis, estes foram lavados com água DI para eliminação do reagente que não reagiu e liofilizados para realização das caracterizações descritas nos tópicos a seguir.

As descrições dos hidrogéis preparados estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: **Códigos usados para descrição dos hidrogéis GelMA.**

CÓDIGO	NÍVEL DE METACRILAÇÃO	NCC (%)	rGo (%)
NB	BAIXO	0	0
NB 5%NCC	BAIXO	5	0
NB 10%NCC	BAIXO	10	0
NB rGO	BAIXO	0	20
NA	ALTO	0	0
NA 5%NCC	ALTO	5	0
NA 10%NCC	ALTO	10	0
NA rGO	ALTO	0	20

3.2.5 Caracterização

As caracterizações foram realizadas nos Laboratórios de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) e demais laboratórios do PPGEM e no Centro de Microscopia da UFMG.

3.2.5.1 Morfologia

Os aparelhos de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (FEI, INSPECT S50) e Metalizador (SPI Suplies - Sputter coater) foram utilizados para preparar (revestimento Au) e coletar as imagens MEV. Imagens 3D também foram obtidas por varredura de amostras com um Micro-CT (SkyScan 1174, Bruker μ CT, Bélgica), com tensão de fonte de 34k, corrente 793 A e tamanho de pixel de 10,03 μ m. Nenhum filtro foi usado. As amostras foram acopladas em um aparelho capaz de girar 180° com coleta de imagem a cada 0,7°.

3.2.5.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram coletados usando o acessório ATR Multi-Bounce em um espectrofotômetro Nicolet 6700. Os espectros foram coletados após 64 varreduras com resolução de 4 cm^{-1}

3.2.5.3 Intumescimento

As amostras foram secas em estufa a 40° C por 24 horas, pesadas e colocadas em 2 ml de água deionizada em tempos pré-determinados (0,5; 1; 4; 8; 24 e 48 h). Após cada tempo de imersão, foram pesados e novamente secos em estufa a 40° C por 24 h. Após a secagem, a massa das amostras foi medida e submetida a um segundo procedimento de intumescimento (re-intumescimento), nas mesmas condições do primeiro procedimento. O teste foi realizado em triplicata para cada hidrogel. As medições de massa, obtidas em cada estágio do processo, foram usadas

para calcular o grau de intumescimento (GI) e o índice de degradação (ID) do material durante os testes usando as seguintes equações, respectivamente:

$$GI (\%) = \frac{M_{hi} - M_{hs}}{M_{hs}} \times 100$$

$$ID (\%) = \frac{M_{si} - M_{sf}}{M_{si}} \times 100$$

onde M_{hs} é a massa do hidrogel seco, M_{hi} massa do hidrogel intumescido, M_{si} é a massa do hidrogel seco inicial e M_{sf} a massa do hidrogel seco ao final do processo.

3.2.5.4 Comportamento dinâmico – mecânico

A análise dinâmico-mecânica (DMA) foi realizada usando um equipamento DMS 6100 SII Exstar em módulo de compressão. Os hidrogéis foram cortados em discos com 6,5 mm de altura e 8 mm de diâmetro e foram intumescidos em água DI antes do teste. Foi aplicado uma força de 3N e amplitude de 10 μm . Os testes foram realizados com amostras submersas em água DI e a 37° C e frequências de 0,05 Hz, 0,1 Hz, 0,2 Hz, 0,5 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 100 Hz e 200 Hz.

3.2.5.5 Microscopia de força atômica (AFM) – nanoindentação

Informações sobre as propriedades mecânicas dos hidrogéis também foram obtidas por meio da coleta de dados de nanoindentação pelas medições de AFM. O protocolo aplicado envolveu a marcação da superfície das amostras usando um cantilever AFM com uma ponta não contato. Uma velocidade de ponta constante de 1 $\mu\text{m s}^{-1}$ foi usada até que a força máxima especificada de 2,5 μN fosse atingida e mantida por 0,5 s. Durante todo o processo de indentação, o deslocamento da ponta foi medido em função da força. O mesmo protocolo foi usado com o hidrogel seco quanto com o intumescido. Este processo foi usado para obter valores de pelo menos 20 nanoindentações por amostra.

3.2.6 Ensaio biológicos

Os ensaios biológicos a seguir foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e o preparo das lâminas histológicas realizado no laboratório de Patogênese Molecular no ICB, UFMG.

3.2.6.1 Cultura de células

As linhagens de células tumorais RKO AS45-1 (Carcinoma do cólon humano) adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC # CRL-2579) foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose em 10% de soro fetal bovino (SFB) e em 1% de estreptomicina penicilina (PEN STREP). As linhagens celulares foram incubadas em atmosfera enriquecida umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C.

Três soluções foram preparadas:

1. Solução fotoiniciador (FI)

1 mL de água Mili-Q estéril foi aquecida em um Eppendorf de 2 mL a 60° C com 10 mg do fotoiniciador.

2. Solução estoque Pré-GelMA

1 mL de DMEM com alto teor de glicose 10% SFB1% PENSTREP foi aquecido em um Eppendorf de 2 mL a 60° C e 100 mg de pré-GelMA liofilizado foram adicionados. A solução foi misturada em Vortex e mantida em banho seco a 37° C.

3. Suspensão de células

As células foram contadas em câmara de Neubauer e foi preparada uma suspensão celular de $6,5 \times 10^5$ células / mL.

3.2.6.2 Polimerização e encapsulamento celular

Para 1 ml da solução pré-GelMA com a suspensão de células, foram usados 500 µl da solução estoque pré-GelMA, 50 µl da solução FI e 450 µl da suspensão celular. 450 µl desta solução resultante foram usados em cada poço da placa de 12 poços, com uma concentração de 3×10^5 células / ml.

A placa foi exposta à incidência de luz ultravioleta composta por três lâmpadas UVC de 9 W por 8 minutos e deixada em estufa à 37° C por 24 horas.

RKO AS45-1 foram encapsuladas em cada um dos hidrogéis descritos anteriormente e renomeados como GelMA NB_RKO, GelMA NB 5% NCC_RKO, GelMA NB 10% NCC_RKO, GelMA NB rGO_RKO, GelMA NA_RKO, GelMA NA 5% NCC_RKO, GelMA NA 10% NCC_RKO, GelMA NA rGO_RKO.

Todo o material utilizado para a polimerização dos hidrogéis foi exposto à luz ultravioleta da capela de fluxo por 20 minutos antes de iniciar os procedimentos para fins de esterilização.

3.2.7 Ensaio de citotoxicidade

3.2.7.1 Análise de viabilidade celular por MTT

Para avaliar a citotoxicidade dos hidrogéis, foi utilizado o ensaio de viabilidade celular MTT. Os hidrogéis sem células foram cortados em aproximadamente 4x4mm, esterilizados por 1 hora em álcool 70%, e após esse tempo, foram lavados 3x em água Mili-Q. Para cada lavagem, os hidrogéis foram submersos por 20 minutos em água Mili-Q.

Os hidrogéis foram colocados em contato direto com a linhagem celular (RKO AS45-1) por 24 horas e 48 horas. Como controles: controle de vida (CV) (negativo): células e meio DMEM alta glicose 10% SFB1% PENSTREP; controle de morte (CM) (positivo): Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Foram realizadas triplicatas biológicas e experimentais. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas SpectraMax M5E (Molecular Devices) a 550 nm.

3.2.7.2 Viabilidade por LIVE DEAD

Para os testes LIVE DEAD, os hidrogéis com a solução contendo RKO foram polimerizados em placas de 12 poços, em triplicatas ao longo de 24 e 48 horas. 300 µl da solução LIVE DEAD (2,0 µM EthD-1 e 1,0 M Calcein AM diluída em PBS) foram adicionados e a placa foi visualizada em um microscópio de fluorescência invertido (filtro Calcein AM 09; filtro EthD-1 15).

A fórmula de viabilidade celular (%) foi usada para contar a viabilidade celular: células viáveis / células totais (células viáveis e não viáveis) x100.

3.2.8 Caracterização Celular

3.2.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Hidrogéis contendo RKO foram fixados com glutaraldeído 2,5% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS gelado (6 ± 2) °C. Em seguida, foram secas por imersão em soluções de concentração crescente de etanol / água (20%, 50%, 90%, 100% v / v) e por fim secas a vácuo em dessecador por 24 horas. As amostras foram recobertas com ouro.

3.2.8.2 Corte histológico

Após 24 horas e 48 horas em estufa a 37° C, os hidrogéis GeIMA NB_RKO e GeIMA NA_RKO foram fixados com formaldeído 4% e posteriormente desidratados, montados, submetidos à microtomia, corados com hematoxilina-eosina e montados em lâminas de vidro.

3.3 Resultado e discussão

3.3.1 Textura de poros

As imagens de MEV, Figura 2A, dos hidrogéis liofilizados sem células incorporadas mostraram estruturas de poros interconectadas, com poros predominantemente arredondados e abertos como observado por outros para outros hidrogéis.⁴¹ Alta porosidade e poros interligados são favoráveis para a fixação e crescimento celular em um biomaterial.³⁶ A Tabela 2 mostra os tamanhos médios de poros encontrados em hidrogéis e medidos por MEV e análise μ -cT.

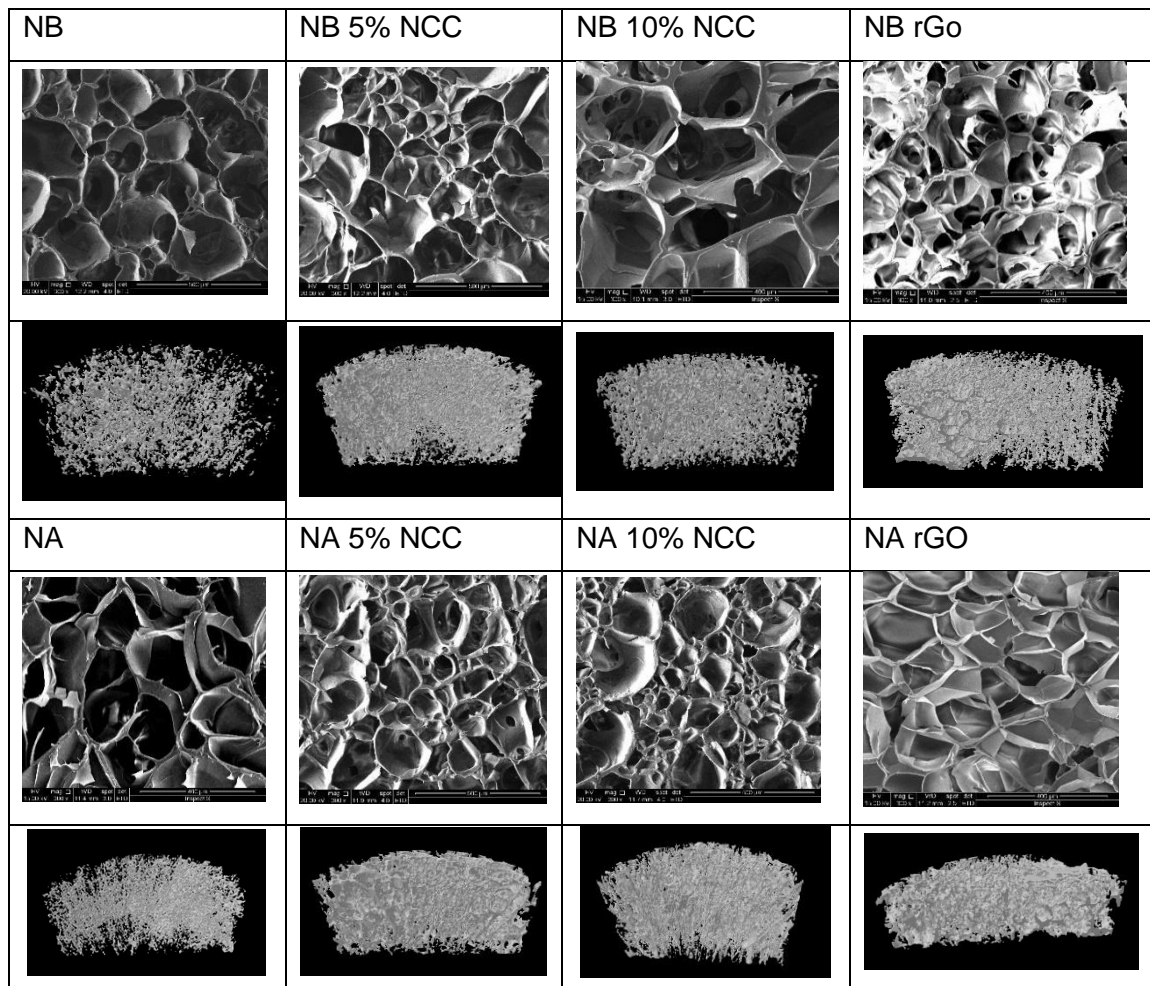
Tabela 2: Valores médios dos diâmetros de poros e porosidade dos hidrogéis GelMA por MEV e análise μ -cT.

GelMA	Diâmetro dos poros		Porosidade (%)
	MEV (μ m)	μ -cT (μ m)	
NB	289±64	240	95
NB 5%NCC	202±46	164	82
NB 10%NCC	303±119	174	86
NB rGO	179±46	175	92
NA	352±96	223	89
NA 5%NCC	286±69	210	82
NA 10%NCC	338±72	195	87
NA rGO	271±67	150	86

Os resultados da Tabela 2 mostraram que o grau de substituição do metacrilóil na gelatina influenciou o tamanho dos poros dos hidrogéis GelMA. Graus mais elevados de substituição de metacrilóil na gelatina tenderam a reduzir a porosidade medida pela análise μ -cT. Foi notado por Celikkin *et al*⁴² para hidrogéis com grupos amina, que níveis mais elevados de substituição de metacrilóil podem estar relacionados a maiores densidades de reticulação. Densidades de reticulação mais altas podem levar a hidrogéis mais rígidos que reduziram a capacidade de geração de poros durante a liofilização para produzir valores mais baixos de porosidade.⁴³ Esta também é a razão para os hidrogéis com nanocomponentes (NCC) exibirem tamanhos de poros menores do que sua contraparte sem NCC. Além disso, os hidrogéis com

nanocomponentes têm parte de sua composição associada a espécies rígidas (NCC e rGO) que não são macios o suficiente para permitir a formação de poros durante a liofilização. Outros já relataram que a adição de nanocomponentes em um hidrogel pode diminuir sua porosidade.⁴³ A observação de uma gama mais ampla de tamanhos de poros na Figura 2B pode ser interessante para a aplicação pretendida (organoides), uma vez que os poros pequenos podem permitir a passagem de nutrientes e oxigênio (15 a 40 μm), enquanto os poros maiores servirão de suporte para o crescimento e proliferação celular.^{37, 38}

A



B

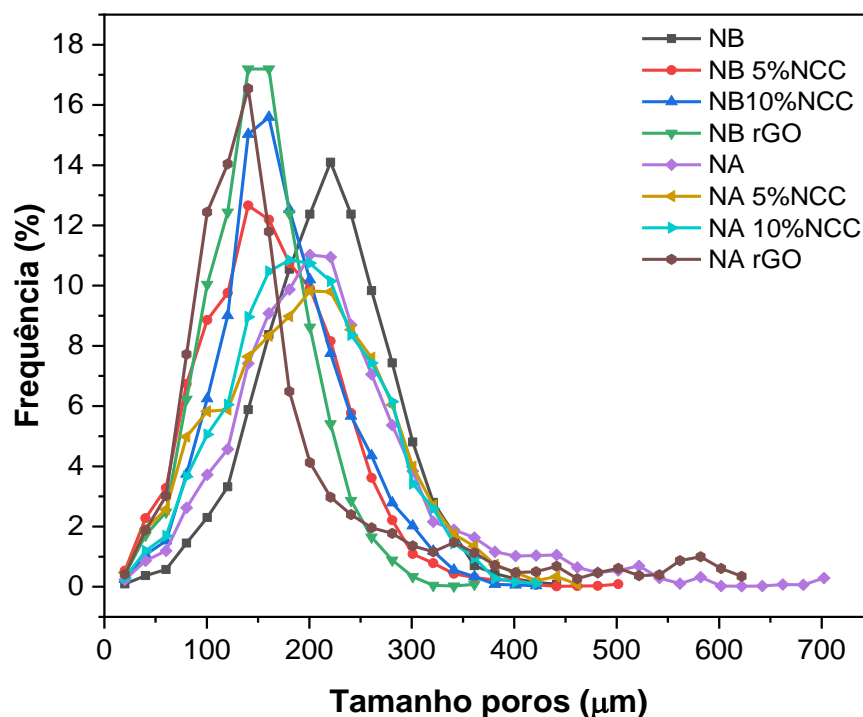


Figura 2: Porosidade dos hidrogéis estudados por microscopia eletrônica de varredura (300x) e vistas laterais de modelos 3D obtidos por μ -CT (A). Curvas de distribuição do tamanho dos poros por μ -CT (B).

3.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

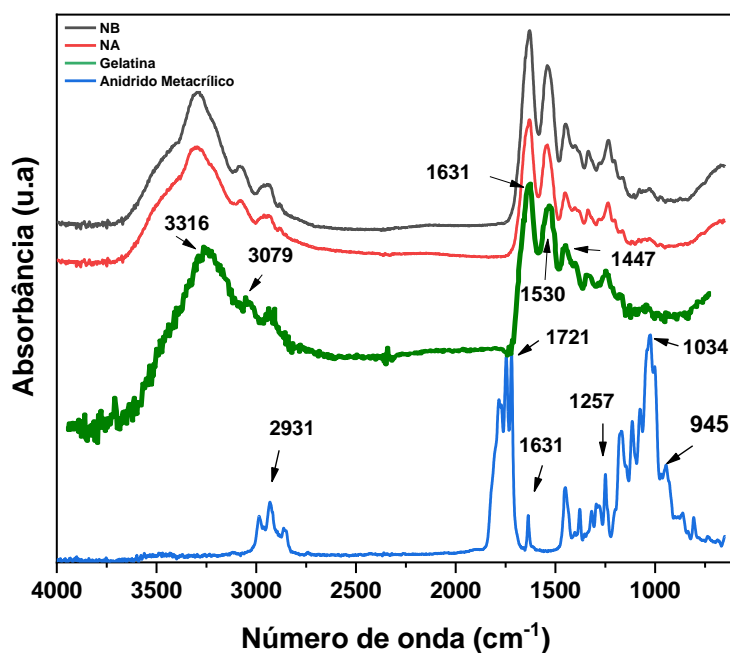
Nos espectros FTIR apresentados na Figura 3A, a gelatina nos hidrogéis é verificada pela presença das bandas de absorção em 3316 cm^{-1} e 3079 cm^{-1} relacionadas ao grupo NH.²² Também é possível observar, a 1631 cm^{-1} , banda típica da ligação C=O, característica da amida I, e bandas de absorbância a 1542 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} relativas às amidas II e III, respectivamente. A banda relacionada ao grupo CH também foi observada em 1447 cm^{-1} .

Algumas bandas de absorção associadas ao anidrido metacrílico podem ser vistas nos espectros FTIR para os hidrogéis, Figura 3^a, em 1034 cm^{-1} devido às ligações C-O.²³ O anidrido metacrílico reage com os grupos amina primários na gelatina para levar à adição de grupos metacriloil nos macrômeros de gelatina.¹⁴ A reticulação GeIMA ocorre quando GeIMA, na presença de um fotoiniciador, é exposto à radiação ultravioleta. Após a absorção da luz ultravioleta, os radicais livres são

formados e o GelMA é então polimerizado por meio da polimerização em cadeia C = C.²⁹

Algumas bandas de absorção em torno de 1100 cm^{-1} associadas a ligações CO em NCC podem ser observadas nos espectros FTIR para as amostras NB 5% NCC, NB 10% NCC, NA 5% NCC e NA 10% NCC na Figura 3B^{24,25} e podem ser usados para comprovar a presença desse nanocomponente nos hidrogéis. Em relação ao óxido de grafeno reduzido presente nos hidrogéis, é possível notar, no espectro da amostra NB rGO, uma banda que vai de aproximadamente 3700 a 2290 cm^{-1} referindo-se à deformação axial OH dos ácidos carboxílicos. Uma banda de absorção em 1700 cm^{-1} devido a $\text{-C}=\text{O}$, comumente encontrada em ácidos carboxílicos, também pode estar associada com carbonil cetona e aldeídos.²⁶ Bandas de absorção em 1228 cm^{-1} , atribuídas ao trecho C-OH e em 1058 cm^{-1} referentes a epóxidos (-C-O-C-), também podem ser identificadas no espectro do hidrogel com rGO.²¹ Esses resultados indicam que o rGO produzido possui diversos grupos contendo oxigênio, como epóxidos, hidroxilas, carbonilas e carboxilas, relacionados à reação com o hidrato de hidrazina.⁴³

A



B

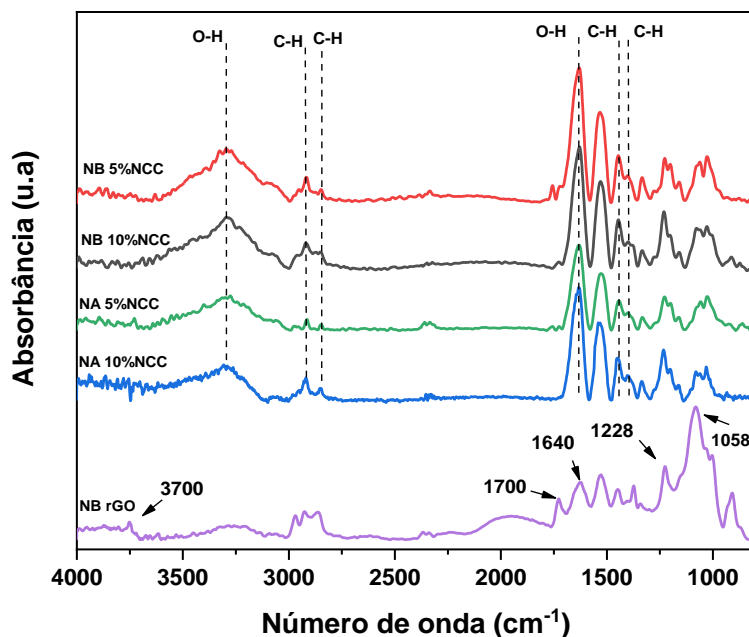


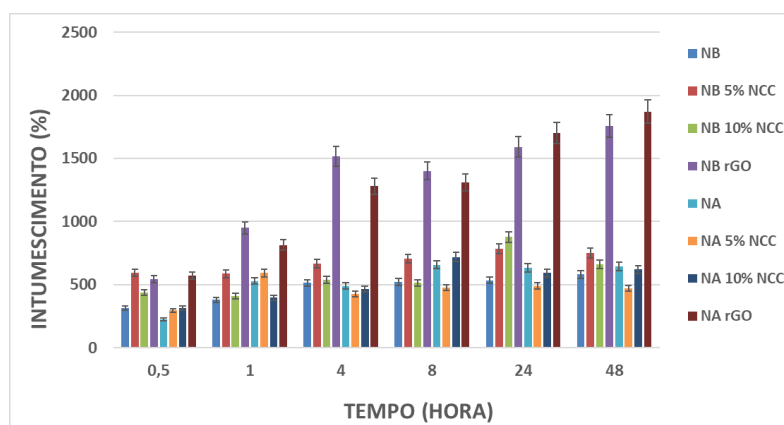
Figura 3: Espectros FTIR de GeIMA NB, GeIMA NA, gelatina e anidrido metacrílico (A), e espectros de GeIMA NB e GeIMA NA contendo NCC e rGO (B).

3.3.3 Características de intumescimento

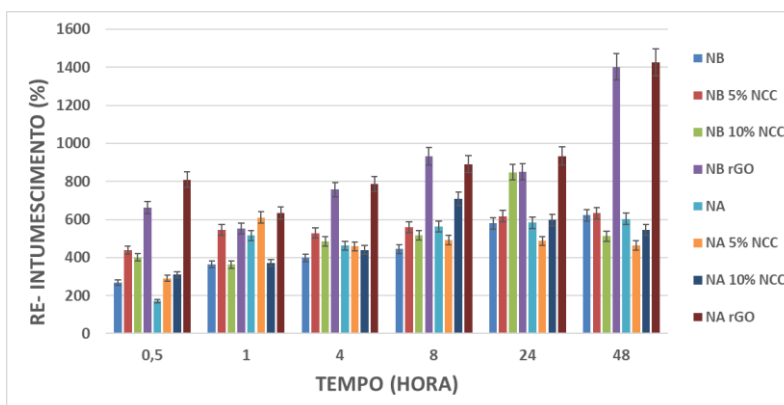
A absorção de água por um hidrogel e sua capacidade de intumescimento são parâmetros importantes para prever a transferência de oxigênio e nutrientes na matriz celular tridimensional.⁴¹ A Figura 4A mostra o grau de intumescimento dos hidrogéis em função do tempo. Os valores de intumescimento de GeIMA NB rGO e GeIMA NA rGO foram muito maiores do que os outros hidrogéis como uma indicação de que o óxido de grafeno poderia ter bloqueado a luz UV durante a polimerização, levando a hidrogéis com densidades de reticulação muito baixas. Os resultados de intumescimento na Figura 4A mostram que todos os hidrogéis atingiram altos níveis de intumescimento após algumas horas de imersão em água DI. Os aumentos nos graus de expansão após 4 horas foram pequenos e menos evidentes. A expansão também tendeu a ser maior para hidrogéis com níveis mais baixos de substituição de metacriloil (indicando densidades de reticulação mais baixas). No entanto, tempos mais longos de imersão mudaram esse comportamento, com hidrogéis com níveis mais altos de substituição de metacriloil inchando mais do que hidrogéis com níveis mais baixos de substituição (sugerindo que densidades de reticulação mais baixas

podem levar a instabilidades de rede associadas à degradação). Nanocristais de celulose em hidrogéis com níveis mais baixos de substituição de metacrilóil levaram a um aumento na expansão, uma vez que a natureza hidrofílica do NCC pode aumentar a absorção de água.⁴⁸ No entanto, para hidrogéis com níveis mais elevados de substituição de metacrilóil (NA) contendo NCC, alguns valores de intumescimento mais baixos do que os hidrogéis NA sem NCC foram observados como uma possível consequência das interações entre cadeias e partículas promovidas pela fotopolimerização.

A



B



C

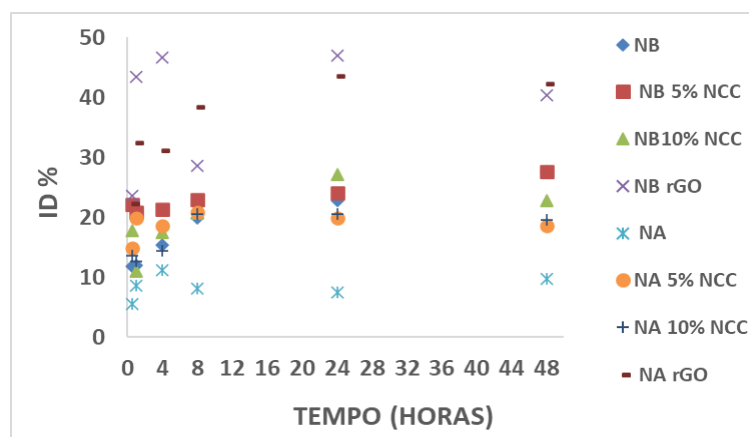


Figura 4: Comparação entre os procedimentos de intumescimento (A) e re-intumescimento (B) das amostras GelMA, GelMA-NCC e GelMA-rGO em função do tempo. Os valores do Índice de degradação dos hidrogéis também são mostrados em (C).

O comportamento de intumescimento dos hidrogéis que foram secos após um experimento de intumescimento e, em seguida, foram expandidos novamente em água DI, é ilustrado na Figura 4B. O resultado geral apresentou comportamento semelhante ao encontrado na primeira etapa de intumescimento, porém com menores valores de absorção de água, principalmente em hidrogéis substituídos com metacrilóil de baixo nível. As diferenças nos valores podem estar associadas a uma perda de material durante as etapas de intumescimento, que pode ser atribuída à degradação e / ou dissolução dos hidrogéis, resultando em redes com uma densidade de reticulação ligeiramente maior.⁴⁹

Os valores para os índices de degradação, mostrados na Figura 4C, variaram de 12 ± 1 a $28 \pm 1\%$ para hidrogéis puros e contendo NCC com baixos níveis de NCC, e de 6 ± 2 a $20 \pm 1\%$ para NCC de alto nível substituído com hidrogéis metacrilóil. Maiores valores de degradação de GelMA NB rGO e NA rGO foram observados por apresentarem menor grau de reticulação devido à menor penetração de luz ultravioleta nas amostras com rGO. Este fato faz com que o GelMA não reticulado se difunda para fora da matriz durante os testes de intumescimento⁵⁰. Valores mais altos de degradação também foram observados para hidrogéis com densidades de reticulação mais baixas (níveis mais baixos de substituição de metacrilóil), indicando que concentrações mais altas de ligações cruzadas são necessárias para a estabilização dos hidrogéis. A incorporação de NCC nos hidrogéis tendeu a aumentar os valores do índice de degradação, sugerindo que esses nanocomponentes também

podem estar interferindo na penetração da luz ultravioleta e, portanto, levando a valores menores de densidades de reticulação (conversão $C = C$) do que seus hidrogéis correspondentes sem NCC.

3.3.4 Propriedades mecânicas

É bem conhecido que as propriedades mecânicas dos tecidos são importantes para guiar a adesão, diferenciação e crescimento celular.^{26,51} Essas propriedades também influenciam as células na expressão de proteínas e moléculas de membrana. Além disso, células e tecidos também são afetados por uma série de cargas mecânicas derivadas da circulação de fluidos corporais, forças de cisalhamento entre partes móveis do corpo, etc. Em algumas aplicações envolvendo organoides, a capacidade de ajustar a rigidez dos hidrogéis para melhor corresponder às propriedades do tecido objetivado (atingir, por exemplo, valores elevados de módulo, como 30 kPa) é desejável.²⁵ Diversas abordagens têm sido propostas e testadas para melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis, como a preparação de hidrogéis híbridos e hidrogéis com redes duplas.²⁵ No entanto, a maioria das propriedades mecânicas relatadas para os hidrogéis preparados foram medidas em condições estáticas, como por meio de testes convencionais de tensão-deformação. Como as cargas mecânicas no corpo são dinâmicas conforme descrito anteriormente, testamos os hidrogéis GelMA NB imersos em água a 37° C e em um ambiente dinâmico mecânico (DMA), Figura 5^a, ou seja, com cargas mecânicas aplicadas em frequências variando de 0,005 a 200 Hz.

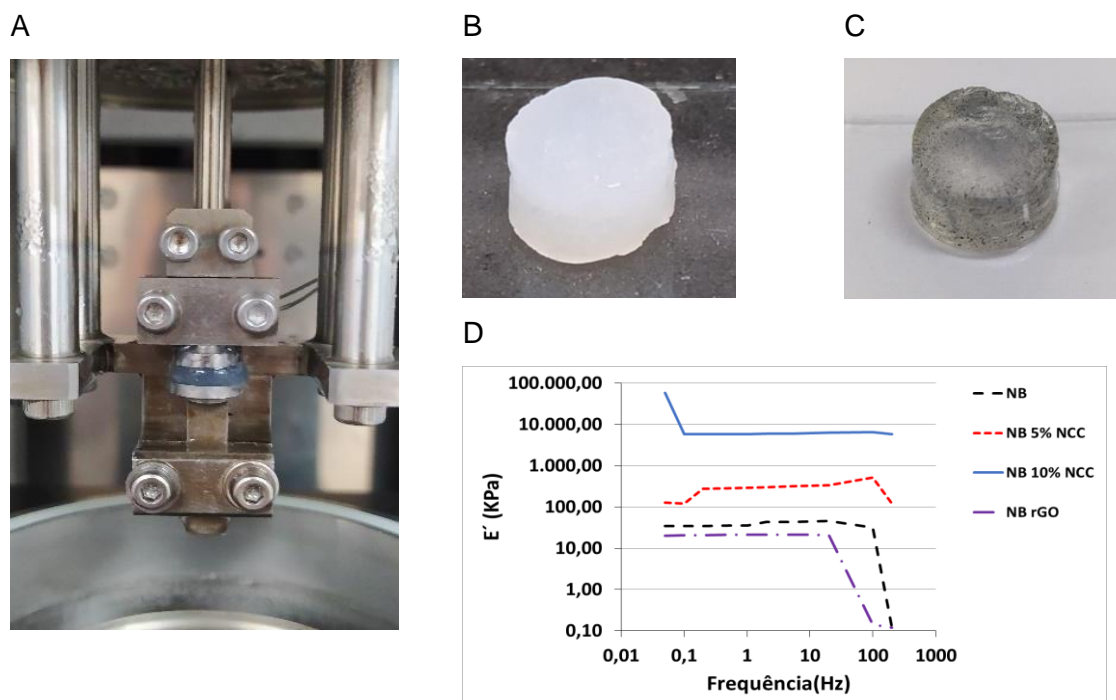


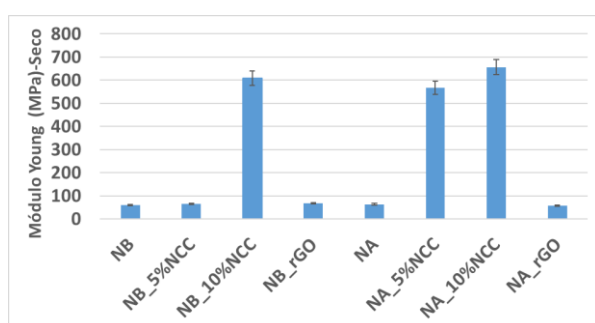
Figura 5: (A) Foto de um hidrogel entre placas de compressão para ser empregado em uma análise mecânica dinâmica (DMA) sob água DI; (B) Foto de um GelMA NA 10% NCC intumescido; (C) Foto de um GelMA NA rGO intumescido; (D) Módulo de elasticidade de armazenamento em função da frequência

De acordo com a Figura 5D, os hidrogéis GelMA NB apresentaram menores valores de E' quando comparados aos hidrogéis GelMA NB com 5% e 10% de NCC, demonstrando uma melhora da propriedade mecânica (rigidez) com a incorporação de NCC. Um comportamento tradicional de E' para materiais viscoelásticos foi observado nas frequências entre 0,05 e 20Hz para todos os hidrogéis testados: um aumento gradual do módulo de armazenamento com frequência, significando que tempos mais curtos de aplicação de carga levam a menor capacidade das cadeias poliméricas para responder ao estímulo mecânico. Para frequências mais altas (≥ 100 Hz), os hidrogéis GelMA NB e GelMA NB rGO pareceram entrar em colapso com uma queda abrupta nas medições de E' . Por outro lado, os hidrogéis GelMA NB com 10% de NCC foram capazes de resistir a frequências mais altas, demonstrando a capacidade do NCC de reforçar e estabilizar mecanicamente os hidrogéis. O fato do GelMA NB rGO ter um menor grau de reticulação (devido aos baixos níveis de conversão de fotopolimerização) é a razão pela qual este hidrogel apresentou valores baixos de módulo de elasticidade (ainda mais baixos do que GelMA NB) e baixa estabilidade em frequências mais altas.

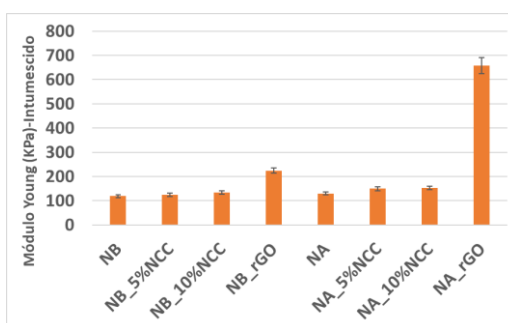
O módulo de elasticidade de tecidos moles normais mostrou variar entre 0,5 kPa (cérebro), 10 kPa (derme) e 12 kPa (músculo), enquanto o módulo de tecidos fibróticos doentes é maior (15-100 kPa).⁵² Por exemplo, o tecido mamário normal mostra módulos entre 6-10 kPa. Esse mesmo tecido com grau intermediário de tumor mamário possui módulo de elasticidade na faixa de 15-20 kPa, enquanto um grau avançado de tumor pode chegar a 40 kPa.⁵² Os resultados na Figura 5D também mostram que é possível ajustar a rigidez dos hidrogéis GeIMA NB de kPa para MPa pela incorporação de NCC.

As propriedades mecânicas dos hidrogéis também foram investigadas por meio de testes de nanoindentação AFM nos estados seco e intumescidos (Figura 6). Os resultados mostram a mesma tendência observada na análise dinâmica mecânica, ou seja, um aumento do módulo devido à presença de NCC nos hidrogéis. Diferentemente do comportamento observado nos resultados de DMA, os hidrogéis com rGO apresentaram maior módulo de elasticidade, como possível consequência do fato de que as medições de nanoindentação podem ser mais afetadas pela presença de uma grande quantidade de rGO nas amostras (as amostras de GeIMA rGO têm 20% em peso de rGO).

A



B



C

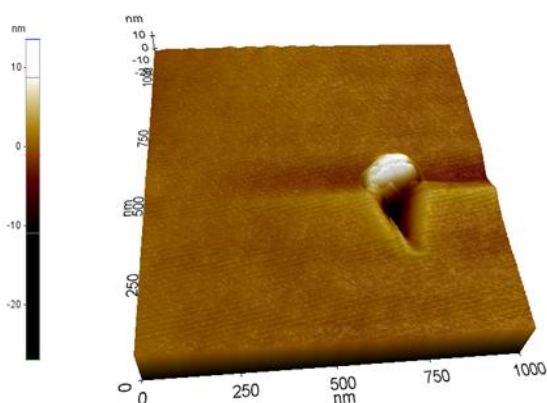


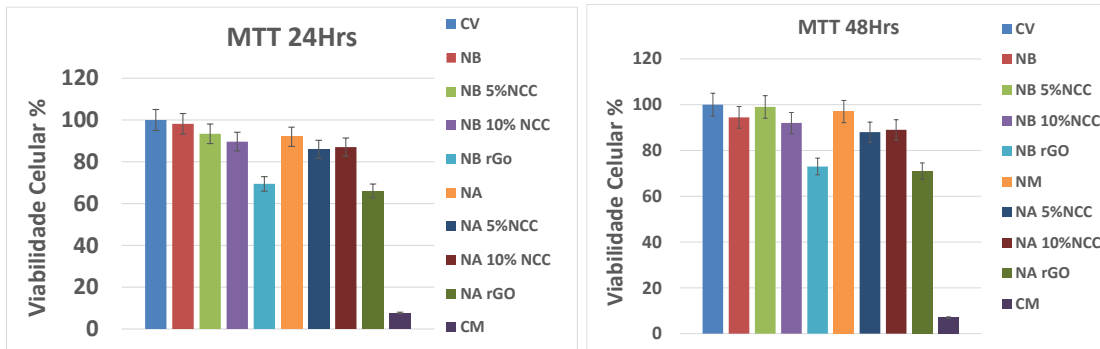
Figura 6: Valores médios do Módulo de Young pelo teste de nanoindentação para hidrogéis secos (A) e para hidrogéis intumescidos (B). (C) Uma imagem topográfica AFM representativa de uma indentação realizada na superfície de um hidrogel.

3.3.5 Citotoxicidade

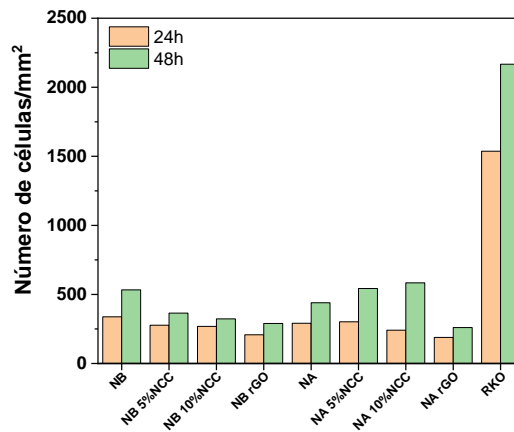
Os resultados relacionados à polimerização de hidrogéis com células incorporadas mostraram que as propriedades dos hidrogéis influenciam no comportamento das células encapsuladas. Os resultados da viabilidade celular por MTT e LIVE DEAD são apresentados na Figura 7. Não houve diferença da sobrevivência dos hidrogéis contendo RKO AS45-1 entre os tempos de 24 e 48 horas, mas foi observado uma tendência na redução durante o tempo de 48 horas. Segundo o teste de comparação múltipla do software SPSS, a perda de viabilidade foi significativa com o grupo controle RKO AS45-1 em relação aos outros hidrogéis, com a exceção ao NB RKO.

Os valores de viabilidade permaneceram acima de 80%, para GelMA NB e GelMA NA, e em seus derivados contendo 5% e 10% de NCC (valores acima dos quais os materiais são considerados não citotóxicos). Não houve diferença significativa na viabilidade celular quando comparada ao grupo controle do ensaio MTT.

A



B



C

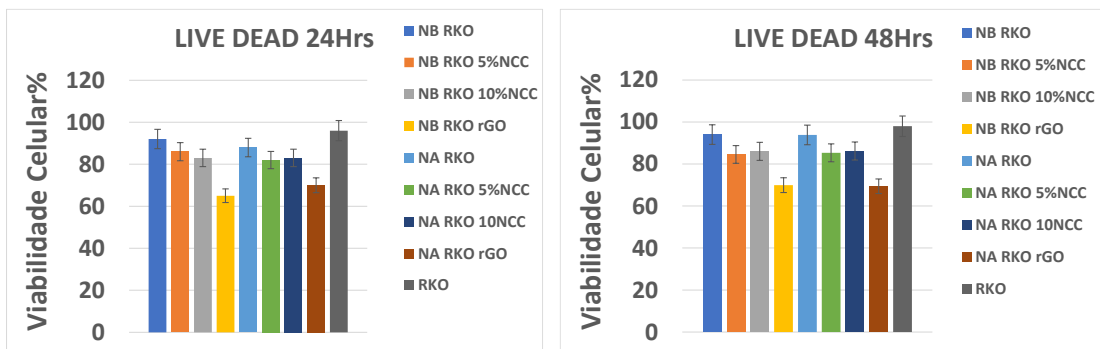


Figura 7: Resultados de viabilidade celular de hidrogéis por MTT (A); Comparação do número de células presentes nos hidrogéis (B); Resultados de viabilidade da linhagem RKO AS45-1, obtido no ensaio LIVE DEAD, no período de 24 e 48 horas, incubadas em atmosfera enriquecida umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C.

Os hidrogéis GelMA NB rGO e NA rGO apresentaram menores valores de viabilidade (aproximadamente 70%). Um maior conteúdo de inorgânicos (como no caso do rGO nesses hidrogéis) e menores densidades de reticulação resultando em

menores graus de estabilidade da rede podem ter levado os hidrogéis a se tornarem menos adequados para as células incorporadas. Zhu *et al*⁵³ encontrou um aumento da proliferação celular nos hidrogéis com o aumento no tempo de cultura, mas após a adição do óxido de grafeno observou uma redução na proliferação celular, mas sem afetar a viabilidade em ambos os grupos.

Figura 7B mostra o número de células/mm² encontradas em todos os hidrogéis e no grupo de controle RKO AS45-1 medido pelo software Image J a partir das imagens registradas pelo microscópio de fluorescência. O número de células contabilizadas nos hidrogéis em 48 horas em uma estufa a 37° C foi maior do que nos hidrogéis em 24 horas. O número de células do grupo controle foi bem superior ao das células contabilizadas nos hidrogéis, mas vale ressaltar que as células RKO foram cultivadas em cultura 2D, sendo a leitura linear, enquanto as células foram contadas nos hidrogéis apenas em um plano de sua estrutura tridimensional. Para hidrogéis com níveis mais baixos de substituição de metacrilóil (GelMA NB), a densidade das células (número de células mm⁻²) tendeu a diminuir para os hidrogéis com NCC como uma possível consequência de níveis mais baixos de estabilidade da rede (Figura 7 C) para esses hidrogéis quando em comparação com o GelMA NB puro que forneceria um ambiente menos adequado para as células migrarem e proliferarem. Por outro lado, para hidrogéis com níveis mais elevados de substituição de metacrilóil (GelMA NA), os resultados na Figura 7B mostraram que a incorporação de NCC tendeu a levar a um ambiente mais favorável para o crescimento celular, possivelmente devido a uma estabilidade de rede mais elevada (Figura 7C) combinada com maiores valores de rigidez (Figura 6B), uma vez que as células tumorais parecem se acomodar melhor em matrizes extracelulares mais rígidas.⁵²

As Figura 8, Figura 9 e Figura do teste LIVE DEAD (coloração com calceína AM) e também imagens de MO e MEV indicaram a presença de células viáveis em hidrogéis GelMA. Foi possível observar um aumento na densidade celular após 48 horas de cultivo, quando comparado ao tempo de 24 horas. Este resultado indica que as células incorporadas foram capazes de proliferar dentro dos hidrogéis devido a um ambiente altamente poroso e quimicamente adequado que se assemelha à matriz extracelular fornecida pelo GelMA.⁴³

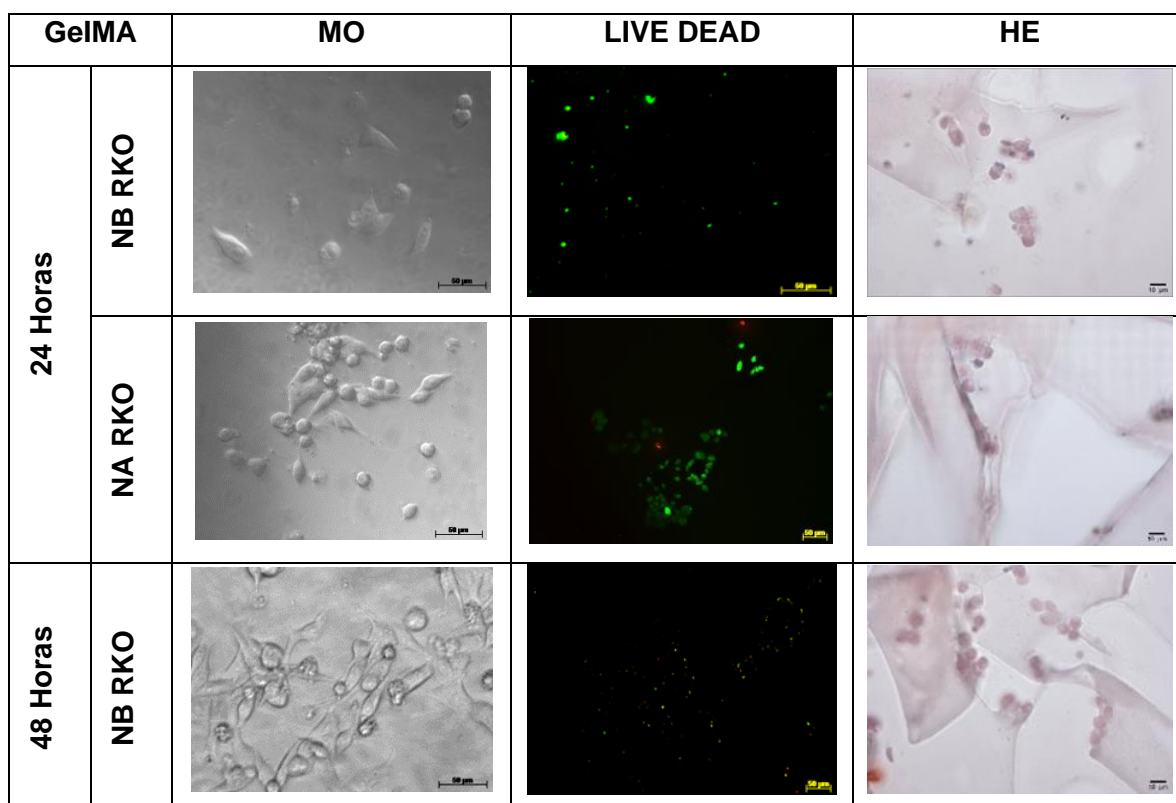
Embora os hidrogéis exibam altos valores de viabilidade e proliferação celular (exceto para hidrogéis com GO), a adesão celular (observada por mudanças na morfologia celular de esférica para alongada) foi observada apenas extensivamente

nos hidrogéis GeIMA NB e GeIMA NA, como mostrado nas imagens de MO na Figura 8.

Porém, ao contrário das células normais, as células tumorais podem apresentar alterações morfológicas na superfície celular, alterando sua adesividade com outras células do tecido e também com substratos não celulares. Assim, a perda de adesão permite que as células cancerosas migrem e proliferem para outras regiões, tecidos ou órgãos por meio de fluidos, da corrente sanguínea e do sistema linfático.⁴⁴

Essa preferência pela adesão celular em hidrogéis sem nanocomponentes pode estar relacionada ao fato de o GeIMA possuir sequências bioativas de aminoácidos derivados da gelatina que podem ser úteis para a fixação celular. Quando os nanocomponentes foram introduzidos no GeIMA, a quantidade relativa de gelatina nos hidrogéis é reduzida, levando a superfícies de poros com um número relativamente menor de espécies bioativas para promover a adesão celular.

A Figura 8 mostra o corte histológico (HE) dos hidrogéis GeIMA NB RKO e NA RKO também demonstram que as células incorporadas com núcleos elípticos e centrais foram capazes de proliferar. Os dados histológicos também confirmam a aderência das células RKO aos hidrogéis sem nanocomponentes.



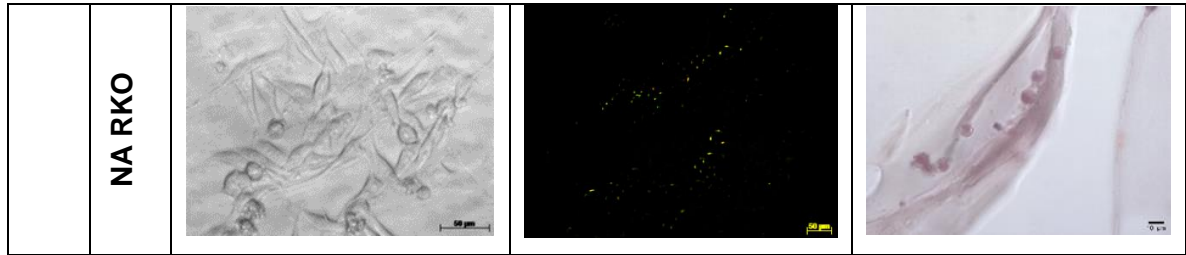
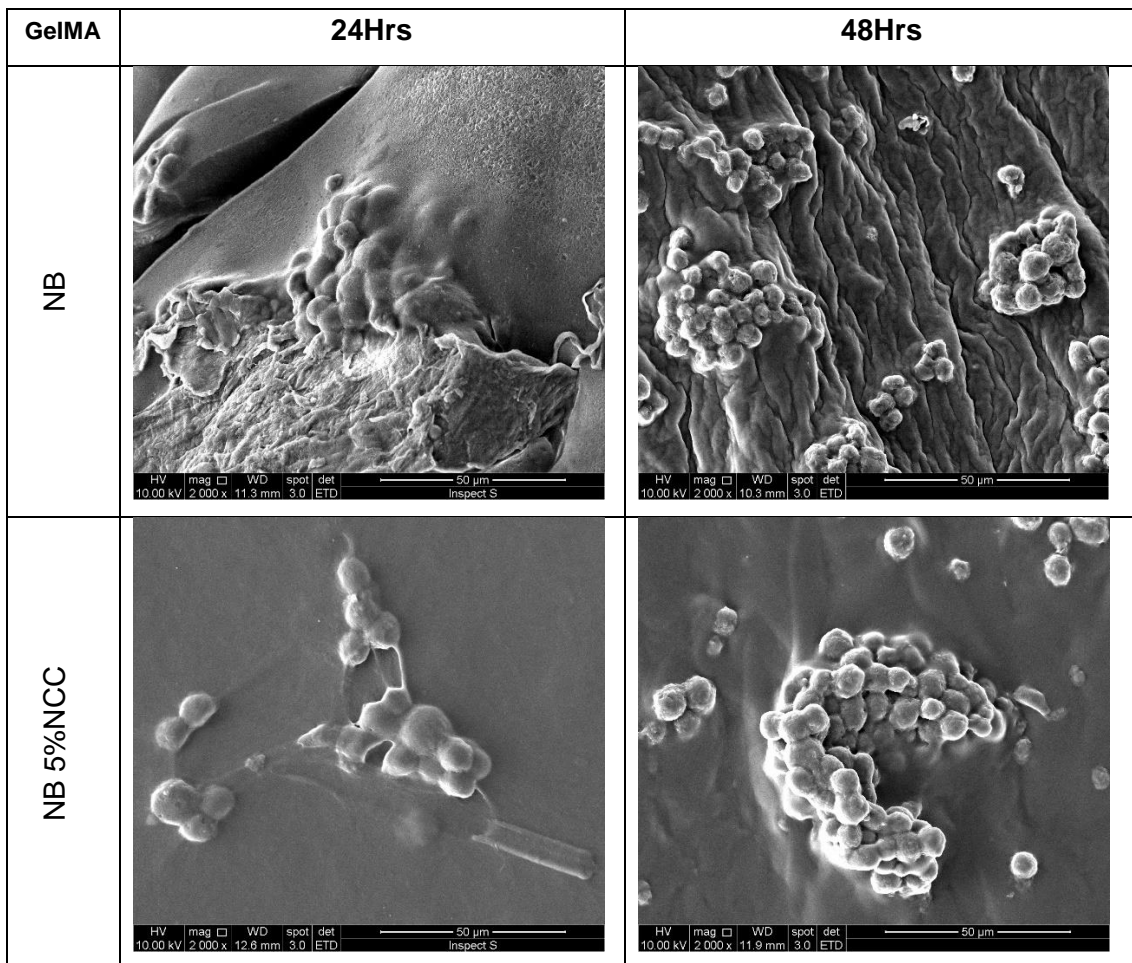
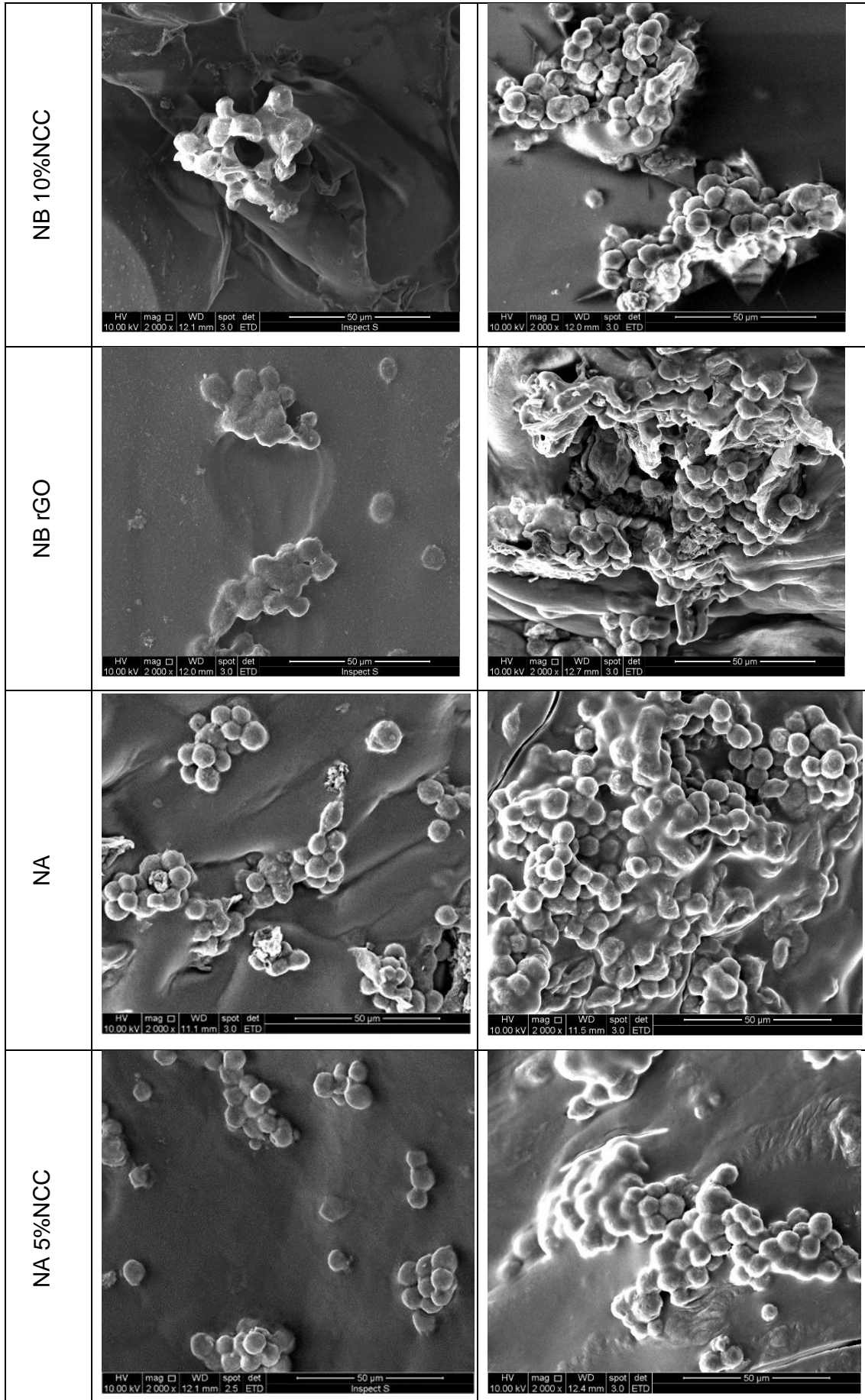


Figura 8: Micrografias da célula RKO AS45-1 nos hidrogéis GelMA NB e GelMA NA RKO em 24 e 48 horas, obtidas ao microscópio óptico (MO), pela marcação LIVE DEAD e pelo corte histológico(60x) com coloração por hematoxilina eosina (HE).

Imagens MEV da seção transversal de hidrogéis (Figura 9) também revelam a capacidade das células incorporadas de proliferar. Além disso, as células também foram capazes de começar a formar grupos maiores organizados após 48 h que podem produzir tecidos tumorais totalmente integrados como a ideia principal para a fabricação de organoides tumorais.





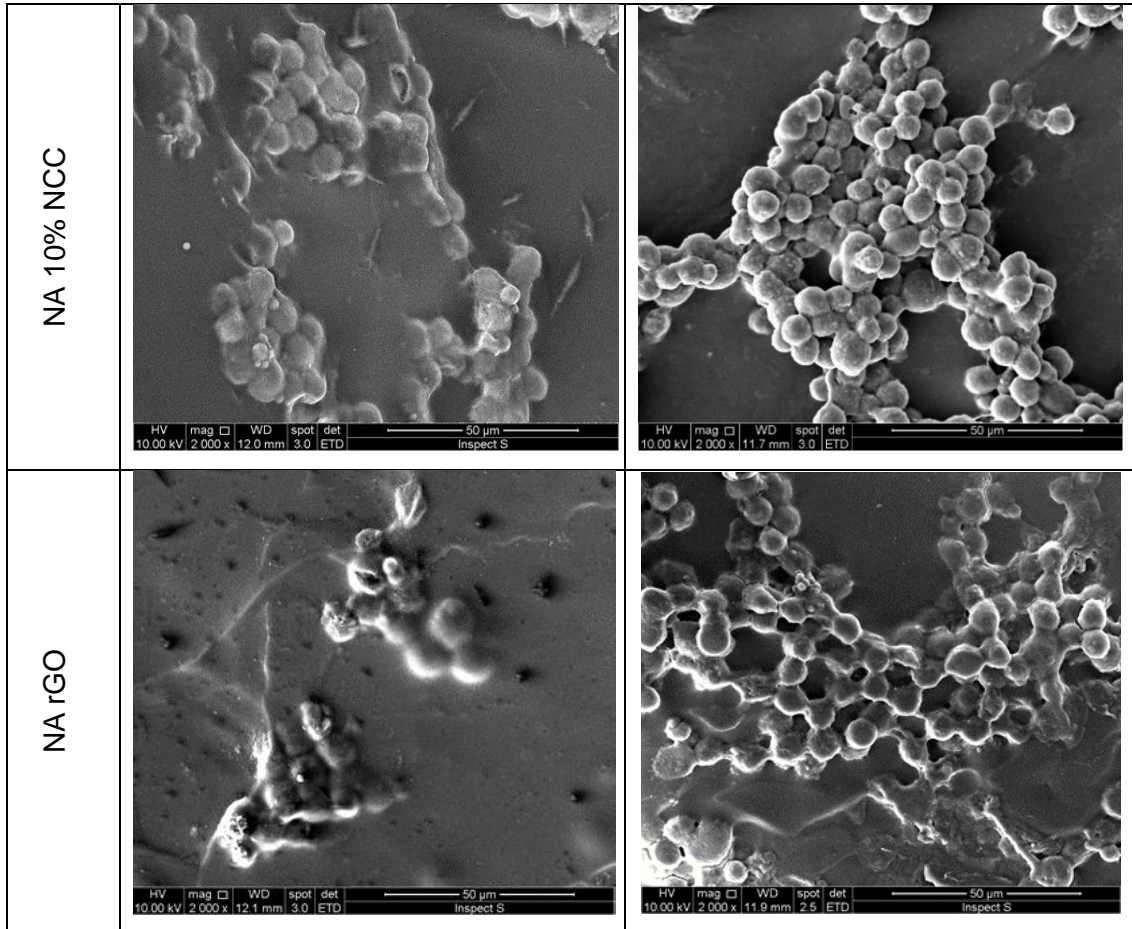


Figura 9: Imagens MEV (2000X) de células RKO AS45-1 apresentadas da seção transversal dos hidrogéis.

3.4 Conclusões

Organoides tumorais podem fornecer ferramentas para estudar a proliferação de células cancerosas, bem como a eficácia de diferentes tratamentos anticâncer. Os hidrogéis surgem como um hospedeiro potencial para as células cancerígenas formarem organoides tumorais, uma vez que têm alta porosidade e altos níveis de hidratação que podem ser ajustados para produzir semelhanças com matrizes extracelulares naturais. Os hidrogéis fotopolimerizáveis à base de gelatina (GelMA) podem ser considerados promissores para esse tipo de aplicação, pois possuem sequências bioativas de aminoácidos, além de alta processabilidade e capacidade de encapsular células. Neste trabalho, exploramos a possibilidade de modificar a estrutura do GelMA para verificar seu efeito sobre as propriedades de encapsulação e proliferação de células cancerosas. Para tanto, foram testados o grau de substituição do metacriloil na gelatina (intimamente relacionado à densidade de

reticulação) e a incorporação de nanocomponentes nos hidrogéis, como nanocristais de celulose (NCC) e óxido de grafeno reduzido (rGO). As análises de MEV e micro-CT mostraram que o GelMA liofilizado exibiu poros interconectados e uma porosidade geral elevada. Os testes de intumescimento realizados no GelMA foram capazes de mostrar que o GelMA com rGO não estava totalmente reticulado devido à restrição da conversão de fotopolimerização. Além disso, altos níveis de substituição de metacrilóil na gelatina levaram a hidrogéis mais estáveis em relação à degradação / dissolução. Os resultados demonstraram que os hidrogéis com NCC foram capazes de suportar altas frequências (até 200 Hz), enquanto os hidrogéis sem NCC falharam mecanicamente em frequências mais baixas. Medidas de nanoindentação de AFM também mostraram que a presença de nanocomponentes aumentou o módulo dos hidrogéis. Os testes de viabilidade demonstraram que as células RKO AS45-1 foram capazes de ser encapsuladas em hidrogéis. Essas células também foram capazes de proliferar dentro do hidrogel. Hidrogéis com altos níveis de substituição de metacrilóil e contendo NCC apresentam taxas de proliferação mais altas como uma possível consequência de níveis mais elevados de estabilidade e rigidez da rede que podem refletir o ambiente tumoral mais comum. Imagens de MEV da seção transversal dos hidrogéis mostraram que células RKO embutidas podem formar grandes colônias de células em 48 horas de cultura, o que indicou a possibilidade de usar hidrogéis derivados de gelatina como uma matriz para apoiar a proliferação de células cancerosas e a formação de organoides tumorais.

4 HIDROGÉIS BASEADOS EM BIOMACROMOLÉCULAS CONTENDO NANOFIBRAS ELETROFIADAS COM PROPRIEDADES E BIOATIVIDADE APRIMORADAS

Resumo: Os hidrogéis fotopolimerizáveis à base de biomacromoléculas, como os derivados da gelatina metacrilóil (GelMA), apresentam grande potencial para aplicações biomédicas, devido à sua alta processabilidade, bioatividade e possibilidade de encapsulamento celular e de fármaco. No entanto, os hidrogéis baseados em biomacromoléculas têm muitas vezes propriedades mecânicas pobres que limitam seu desenvolvimento e aplicação. Neste trabalho, testamos uma nova abordagem para produzir hidrogéis baseados em biomacromoléculas com propriedades e bioatividade aprimoradas por meio da incorporação de mantas de nanofibras de policaprolactona (PCL) eletrofiadas contendo GelMA em hidrogéis GelMA. A presença de GelMA nas nanofibras foi projetada para melhorar a integração entre as mantas de nanofibras eletrofiadas e a matriz de hidrogel GelMA. Para tanto, hidrogéis híbridos GelMA foram preparados por dois métodos: (1) fotopolimerização de uma mistura de mantas picadas de nanofibras e GelMA e (2) fotopolimerização de pilhas de mantas de nanofibras impregnadas com GelMA. Foram avaliadas a morfologia, intumescimento, biodegradação, propriedades mecânicas e encapsulamento celular, viabilidade e proliferação dos hidrogéis híbridos obtidos. Os resultados da espectroscopia de infravermelho e da calorimetria exploratória diferencial indicaram o sucesso da incorporação do GelMA nas mantas de nanofibras eletrofiadas. Imagens de microscopia eletrônica de varredura mostraram paredes de poros de hidrogéis liofilizados decorados com mantas picadas de nanofibras. Os testes de intumescimento mostraram que a presença das mantas de nanofibras dentro dos hidrogéis não impediu que os hidrogéis intumescessem na água. As propriedades mecânicas dos hidrogéis contendo pilhas de mantas de nanofibras foram muito maiores do que os hidrogéis puros. Hidrogéis híbridos com mantas picadas de nanofibras foram capazes de encapsular células RKO AS45-1. As células encapsuladas mostraram ser capazes de proliferar dentro dos hidrogéis. Além disso, observou-se que a população de células dentro dos hidrogéis híbridos aumentou mais rápido do que nos hidrogéis sem mantas de nanofibras, como uma evidência de que a textura semelhante à matriz extracelular das mantas de nanofibras dentro dos hidrogéis híbridos pode aumentar a bioatividade dos materiais. Os resultados gerais

revelaram que as abordagens testadas para preparar hidrogéis híbridos podem expandir o uso de hidrogéis baseados em biomacromoléculas em aplicações biomédicas.

4.1 Introdução

Os hidrogéis são materiais que têm a capacidade de expandir e reter uma quantidade significativa de água em sua estrutura. Além de serem utilizados nas mais diversas aplicações, os hidrogéis possuem textura semelhante aos tecidos naturais devido ao seu alto teor de água e porosidade.⁵⁵ A capacidade dos hidrogéis de absorver água é atribuída à presença de grupos funcionais hidrofílicos ligados ao polímero, enquanto sua resistência à dissolução resulta de ligações cruzadas entre as cadeias.⁵⁶

Devido ao seu alto teor de água, alguns hidrogéis não cumprem as propriedades mecânicas exigidas para várias aplicações de engenharia de tecidos.⁵⁷ Os hidrogéis são geralmente macios e frágeis para serem usados em várias aplicações que requerem um mínimo de carga em seu comportamento. Portanto, o desenvolvimento de hidrogéis com alta resistência mecânica é um desafio crítico para expandir o leque de aplicações dos hidrogéis para engenharia de tecidos. Estratégias para melhorar suas propriedades mecânicas e estabilidade incluem a combinação com outros polímeros ou nanopartículas e a formação de redes duplas.⁵⁸ Caracterização de propriedades estruturais como porosidade, módulo de elasticidade, intumescimento, degradação e até mesmo parâmetros associados à resposta celular, como viabilidade celular, proliferação, diferenciação e disseminação é a forma de determinar a adequação desses hidrogéis para diferentes aplicações.^{56,59} Os hidrogéis também foram estudados e testados para atuar como uma matriz para encapsular células e ilhotas de pequenos tecidos, uma vez que podem manter a integridade e proliferação dessas células.^{56, 60}

A gelatina metacrilóil (GelMA), também conhecida como gelatina metacrilada, é um hidrogel polimerizável que vem sendo testado e estudado devido à sua facilidade de síntese, seu custo benefício, além de ser biocompatível para aplicações celulares.²⁸ O GelMA oferece grande versatilidade no ajuste de suas características, manipulando sua síntese e processamento, tornando-o adequado para uma ampla

gama de aplicações. Os hidrogéis GelMA também podem ser submetidos a tratamentos de liofilização para gerar estruturas porosas com tamanhos e densidades de poros controlados.⁶¹ Além disso, uma vez que GelMA é derivado de gelatina, possui bioatividade natural de sequências de aminoácidos presentes na gelatina que podem ser úteis no fornecimento de locais para interações células-biomateriais específicas.

GelMA tem sido frequentemente usado como componente de hidrogéis híbridos. Alguns materiais que foram usados em combinação com GelMA são biopolímeros, partículas inorgânicas e polímeros sintéticos. A seleção dos componentes da mistura dependerá da aplicação pretendida. Por exemplo, partículas de hidroxiapatita têm sido usadas em combinação com GelMA para promover a osteoindução; ácido hialurônico-GelMA para imitar o tecido cardiovascular; e poli (etileno glicol) para reforçar as construções GelMA destinadas ao tecido conjuntivo.³³

As mantas de nanofibra eletrofiadas podem ser consideradas um candidato potencial para um agente de reforço em hidrogéis. A técnica de eletrofiação pode preparar nanofibras com alta área superficial e porosidade, compostas por fibras ultrafinas com diâmetros que variam de algumas dezenas de nanômetros a alguns micrômetros. É uma técnica versátil, pois permite o uso de uma variedade de polímeros, mistura de polímeros, e materiais inorgânicos, bem como a integração de aditivos, biomoléculas e células vivas, atendendo aos requisitos exigidos por diferentes aplicações³³. Além disso, as mantas de nanofibra eletrofiadas exibem características estruturais que se assemelham à matriz extracelular do corpo (ECM) que podem aumentar a fixação e o crescimento celular.

Neste trabalho, propomos a preparação de hidrogéis híbridos através da combinação de hidrogéis com partes de nanofibras que aproveitariam o estado altamente hidratado, porosidade e bioatividade dos hidrogéis de metacrilato de gelatina (GelMA) e a alta área superficial, versatilidade, morfologia e textura de nanofibra eletrofiadas. A presença de nanofibra dentro dos hidrogéis pode ser útil para melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis, bem como para fornecer uma textura semelhante à matriz extracelular que poderia aumentar a adesão e proliferação celular. Além disso, a possibilidade de adaptar a composição e morfologia das nanofibras eletrofiadas pode fornecer uma ferramenta importante para projetar os hidrogéis híbridos para outras funções especiais, como entregar drogas, aumentar as propriedades elétricas, etc. Para que este hidrogel híbrido funcione corretamente,

seria fundamental que um grande nível de integração entre as nanofibras eletrofiadas e o hidrogel pudesse ser alcançado. Assim, neste trabalho, projetamos e preparamos mantas de nanofibras eletrofiadas contendo gelatina metacrilil (antes da fotopolimerização) e policaprolactona (PCL) (um conhecido polímero biodegradável). Essas mantas de nanofibras foram então (1) cortadas em pequenos pedaços, misturadas com solução de gelatina de metacrilil e submetidas à fotopolimerização ou (2) impregnadas com solução de gelatina de metacrilil, estaqueadas para produzir laminados e submetidas à fotopolimerização. A Figura 10 mostra esquematicamente nossa abordagem para preparar os hidrogéis híbridos com pedaços de nanofibras eletrofiadas. A gelatina de metacrilil dentro das nanofibras pode participar na fotopolimerização do hidrogel, bem como pode parcialmente lixiviar para fornecer rugosidade e porosidade nas nanofibras que podem melhorar a interação e integração entre o hidrogel e as mantamantas de nanofibras.

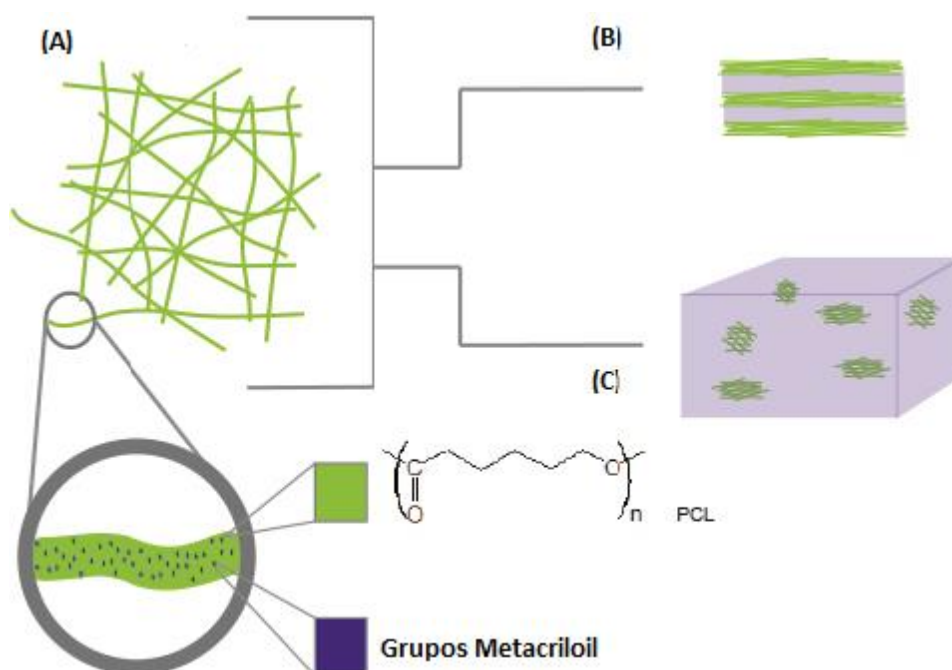


Figura 10: Esquema de preparação de hidrogéis híbridos com mantas de nanofibras: (A) mantas de nanofibras PCL eletrofiadas contendo pré-GelMA (grupos metacrilato); (B) hidrogel GeIMA com pilhas de mantas de nanofibras eletrofiadas impregnadas com GelMA; (C) hidrogel GeIMA com pedaços de nanofibras eletrofiadas.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais

Gelatina de pele porcina Tipo A ~ 300 Bloom (Sigma-Aldrich, G1890), anidrido metacrílico MAA (Sigma-Aldrich, 276685), Membrana de diálise Spectro / MWCO 12-14 kDa (Fisher Scientific), 2-hidroxi-4'- (2-hidroxietoxi) -2-metilpropilfenona (Sigma-Aldrich, 410896-10G), policaprolactona ($M_n = 80.000 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, 440744), 2,2,2-Trifluoroetanol (TFE, Sigma-Aldrich T63002), Dulbecco's Modified Eagle's High (Life Technologies, 11320033), Soro fetal bovino (Gibco), 0 Trypsin 0.25 % (Gibco), Penicilina estreptomicina (Gibco by Life Technologies).

4.2.2 Preparo Pré-GelMA

A síntese da gelatina metacrilol foi realizada pela adição de 10 g de gelatina em 100 ml de PBS (pH 7,4) a 50° C até a completa dissolução. Em seguida, 4 mL de anidrido metacrílico foram adicionados à solução e agitados durante 2 horas a 50° C. A solução foi colocada em uma membrana para realizar a diálise por 5 dias em água DI, sob agitação. A água foi trocada duas vezes por dia. O denominado pré-GelMA, isto é, gelatina com grupos polimerizáveis (C = C), foi congelado e depois liofilizado.

4.2.3 Preparo de hidrogéis GelMA

Solução com 10 mg de 2-hidroxi-4'- (2-hidroxietoxi) -2-metilpropilfenona (fotoiniciador), 1 ml de água ultrapura e 100 mg de pré-GelMA liofilizado foi submetida à luz UV (comprimento de onda na faixa de 360- 480 nm) 6,9 mW cm⁻² durante 16 minutos para fotopolimerização. A distância entre a luz ultravioleta e a amostra foi de 6 cm.

4.2.4 Preparo nanofibras GelMA / PCL

Pré-GelMA e PCL foram dissolvidos em uma mistura de TFE e ácido acético à temperatura ambiente e sob agitação. Duas formulações foram preparadas com diferentes proporções de GelMA nas composições finais da fibra: 25 e 50% em massa. A seguir, a solução resultante foi colocada em uma seringa de vidro de 5 mL e empregada no sistema de eletrofiação.

A Tabela 3 resume as diferentes composições das soluções poliméricas e as condições aplicadas na eletrofiação.

Tabela 3: Composição das soluções submetidas à eletrofiação e parâmetros associados ao processo.

Nomenclatura	<u>Polímero</u>		<u>Solvente</u>		<u>Parâmetros Eletrofiação</u>		
	Pre-GelMA(g)	PCL(g)	TFE (mL)	Ácido Acético(mL)	Vazão (mm/h)	Tensão (kV)	Distância (cm)
G25P75	0,25	0,75	8	2	3	21	10
G50P50	0,50	0,50	8	2	3	21	10

4.2.5 Preparação de hidrogéis GelMA contendo nanofibras eletrofiadas

Dois métodos diferentes foram usados para preparar hidrogéis híbridos compreendendo nanofibras eletrofiadas e GelMA (Figura 10):

- 1- Fotopolimerização de uma mistura de pré-GelMA e mantas de nanofibras eletrofiadas previamente cortadas em pequenos pedaços;
- 2- Fotopolimerização de uma pilha de mantas de nanofibras eletrofiadas impregnadas com pré-GelMA.

4.2.6 Hidrogéis híbridos derivados de uma mistura de nanofibras eletrofiadas e GelMA

As mantas de nanofibra eletrofiadas G25P75 e G50P50 foram cortadas manualmente para produzir pequenos pedaços com média de 1 mm². 25 mg de mantas picadas (G25P75 ou G50P50) foram misturados com 2 ml de água deionizada e 200 mg do pré-GelMA. A dispersão resultante foi misturada em vórtex por 10 minutos e submetida à luz ultravioleta por 10 minutos, formando os hidrogéis denominados GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50. Os hidrogéis obtidos foram posteriormente liofilizados.

4.2.7 Preparação de uma pilha de nanofibras eletrofiadas impregnadas com pré-GelMA

Uma lâmina de vidro foi colocada no coletor de eletrofição. As mantas de nanofibras G25P75 e G50P50, em momentos independentes, foram eletrofiadas na lâmina durante 15 minutos. 1 mL da solução pré-GelMA (200 mg do pré-GelMA em 2 mL de água deionizada) foi então depositado no topo da manta eletrofiada. Outra camada da manta foi eletrofiada sequencialmente no topo da primeira camada da manta eletrofiada impregnada. Pilhas de mantas de nanofibras impregnadas com GelMA pré-impregnadas com 2 e 4 mantas foram produzidas, conforme mostrado esquematicamente na Figura 11.

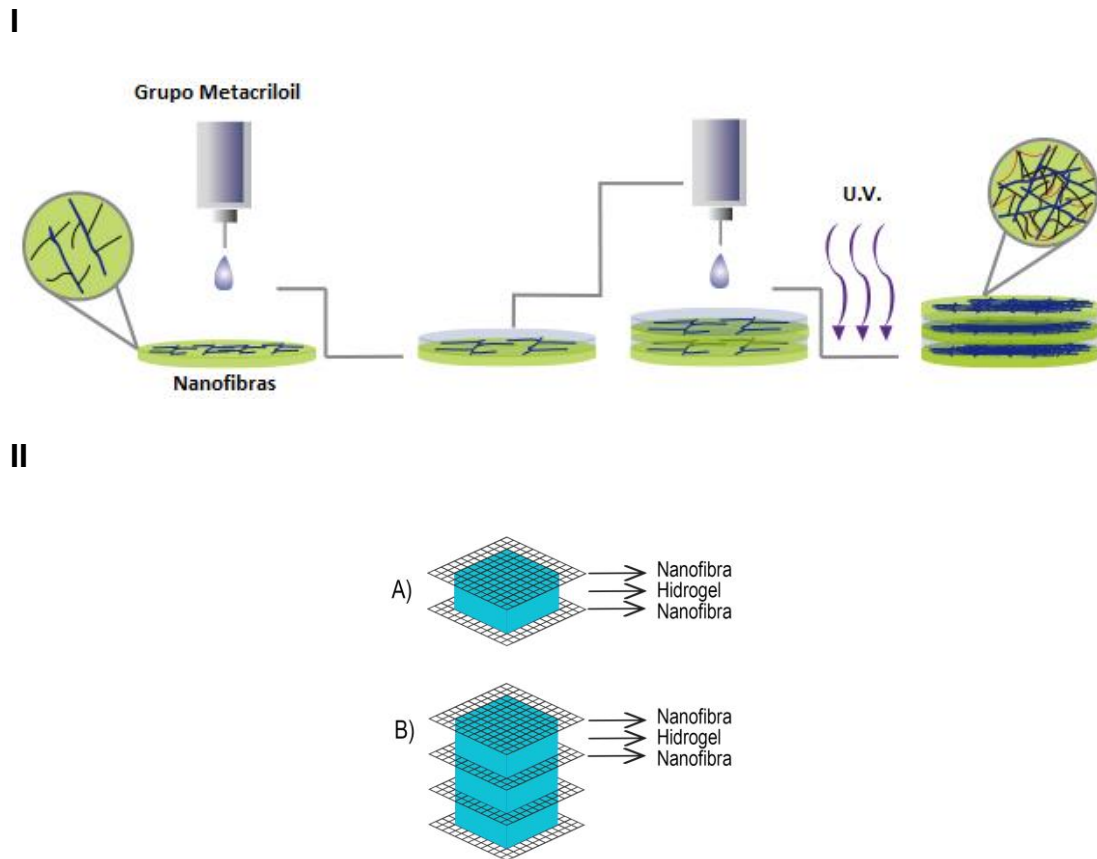


Figura 11: Representação das pilhas de mantas eletrofiadas pré-impregnadas com pré-GelMA: I: A- Reação de fotopolimerização do GelMA com altos níveis de integração interfacial entre as nanofibras e a matriz de hidrogel. II: Representação de hidrogéis GelMA com duas (A) e quatro (B) mantas de nanofibras impregnadas (GelMA₂ * nanofibra e GelMA₄ * nanofibra)

Após a fotopolimerização dos hidrogéis GelMA com duas mantas de nanofibras, GelMA₂ * G25P75 e GelMA₂ * G50P50, e com quatro mantas, GelMA₄ * G25P75 e GelMA₄ * G50P50, foram liofilizadas para realização das caracterizações descritas nos tópicos abaixo.

4.2.8 Caracterização e determinação de propriedades

As caracterizações foram realizadas nos Laboratórios de Engenharia de Polímeros e Compósitos (LEPCom) e demais laboratórios do PPGEM e no Centro de Microscopia da UFMG. Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.2.8.1 Morfologia

Microscopia Eletrônica de Varredura (FEI, INSPECT S50) foi usada para obter imagens de MEV da mistura GelMA com nanofibras e da pilha de mantas de nanofibras eletrofiadas pré-GelMA impregnadas. As amostras também foram digitalizadas usando um Micro-CT (SkyScan 1174, Bruker μ CT, Bélgica), com tensão de fonte de 34k, corrente de 793A e tamanho de pixel de 10,03 μ m. Nenhum filtro foi usado. As amostras foram colocadas em um aparelho capaz de girar 180° com imagens a cada 0,7°.

4.2.8.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando o acessório ATR Multi-Bounce em um espectrômetro Nicolet 6700 e os espectros foram coletados após 64 varreduras com uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.8.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas sob atmosfera de nitrogênio. As amostras foram aquecidas de -10 a 150° C, a 10° C min^{-1} usando um equipamento DSC EXSTAR 7020 e atmosfera de N₂. Uma primeira corrida de aquecimento até 120° C foi realizada para eliminar a água adsorvida.

4.2.8.4 Intumescimento

Amostras com média de 1,5 x 1,5 cm foram secas em estufa a 40° C por 24 horas, pesadas e colocadas em 2 ml de água DI por 24 horas. Após o tempo de imersão, foram pesados e novamente secos em estufa a 40° C por 24h. O teste foi realizado em triplicata para cada hidrogel. As medições de peso, obtidas em cada estágio do processo, foram usadas para calcular o grau de intumescimento (GI) e o

índice de degradação (ID) do material durante o procedimento usando as seguintes equações, respectivamente:

$$GI (\%) = \frac{M_{hi} - M_{hs}}{M_{hs}} \times 100$$

$$ID(\%) = \frac{M_{si} - M_{sf}}{M_{si}} \times 100$$

onde M_{hs} é a massa do hidrogel seco, M_{hi} massa do hidrogel dilatado, M_{si} é a massa do hidrogel seco inicial e M_{sf} a massa do hidrogel seco no final do processo.

4.2.8.5 Testes de tração

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram investigadas por meio de ensaios de tração realizados em máquina universal de ensaios EMIC / Instron DL3000, utilizando célula de carga 20 N. Os hidrogéis foram mantidos intumescidos por 24 horas antes dos testes. Eles foram cortados em tiras retangulares com 30 mm de comprimento e 6 mm de largura. 6 amostras de cada hidrogel foram usadas para os testes. Uma taxa de deformação constante de 5 mm min⁻¹ foi aplicada à temperatura ambiente.

4.2.8.6 Cultura de células *in vitro*

As células tumorais RKO AS45-1 (Carcinoma do cólon humano) adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC # CRL-2579) foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose em 10% de soro fetal bovino (SFB) e em 1% de estreptomicina penicilina (PEN STREP). As células foram incubadas em atmosfera enriquecida umidificada contendo 5% de CO₂ a 37° C.

4.2.8.7 Encapsulamento RKO AS45-1 em mistura fotopolimerizável de mantas de nanofibras eletrofiadas e GelMA

Três soluções foram preparadas:

1- Solução FI

1 mL de água Mili-Q estéril foi aquecida em um Eppendorf de 2 mL a 60 °C com 10 mg do fotoiniciador.

2- Solução estoque Pré-GelMA

1 mL de DMEM com alto teor de glicose 10% SFB1% PENSTREP foi aquecido em um eppendorf de 2 mL a 60° C e 100 mg de pré-GelMA liofilizado foram adicionados. A solução foi misturada em Vortex e mantida em banho seco a 37° C. Para misturas de hidrogéis GelMA com mantas de nanofibras, foram adicionados 25 mg das mantas picadas de nanofibras de G25P75 e G50P50.

3- Suspensão de células

As células foram contadas em câmara de Neubauer e uma suspensão celular de $6,5 \times 10^5$ células / mL foi preparada.

4.2.8.8 Polimerização e encapsulamento celular

500 µl da solução estoque pré-GelMA com pedaços de mantas, 50 µl da solução FI e 450 µl da suspensão de células foram colocados juntos e misturados. 450 µl desta solução resultante foram usados em cada poço da placa de 12 poços, com uma concentração de 3×10^5 células / ml.

A placa foi exposta à incidência de luz ultravioleta composta por três lâmpadas UVC de 9 W por 8 minutos e deixada em estufa a 37° C por 24 horas.

As seguintes composições de hidrogel descritas anteriormente foram usadas para encapsular células: GelMA, GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50.

Todo o material utilizado para a polimerização dos hidrogéis foi exposto à luz ultravioleta da capela de fluxo por 20 minutos antes do início dos procedimentos.

4.2.9 Caracterização de células

4.2.9.1 Análise da viabilidade celular por MTT de hidrogéis preparados pela mistura de pedaços de mantas de nanofibras eletrofiadas e GelMA

Para avaliar a citotoxicidade do GelMA, GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50, foi empregado um ensaio colorimétrico MTT.

Os hidrogéis sem células foram cortados em aproximadamente 4x4mm, esterilizados por 1 hora em álcool 70%, e após esse tempo, foram lavados 3x em água Mili-Q. Para cada lavagem, os hidrogéis foram submersos por 20 minutos em água Mili-Q.

Os hidrogéis foram colocados em contato direto com a linhagem celular normal (RKO AS45-1) por 24 horas e 48 horas. Os controles foram: controle de vida (CV) (negativo) - células e o DMEM alta glicose 10% SFB1% PENSTREP; controle de morte (CM) (positivo) - Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Experimento em triplicata foram realizados. A leitura foi obtida em um leitor de microplacas SpectraMax M5E (Molecular Devices) a 550nm.

4.2.9.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Hidrogéis com células incorporadas foram fixados com glutaraldeído 2,5% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS gelado (6 ± 2) °C. Foram secas por imersão em soluções de concentração crescente de etanol / água (20%, 50%, 90%, 100% v / v) e, por fim, secas a vácuo em dessecador por 24 horas. As amostras foram cobertas com ouro.

4.3 Resultado e discussão

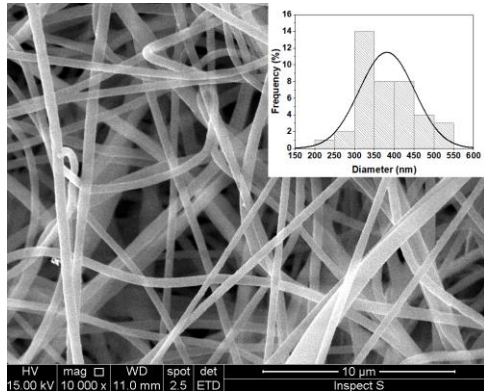
4.3.1 Morfologia de nanofibras eletrofiadas e hidrogéis contendo pedaços de mantas de nanofibras eletrofiadas

As Figura 12A e B mostram micrografias das nanofibras G25P75 com 25% em massa de GelMA e 75% em massa de nanofibras PCL e G50P50 com 50% em massa de cada componente, respectivamente. As nanofibras eletrofiadas apresentaram fibras bem formadas, distribuídas aleatoriamente e sem grânulos (*beads*). A produção de estruturas fibrosas sem grânulos pode ser alcançada quando o controle adequado da tensão superficial e da taxa de evaporação do solvente é obtido.⁶²

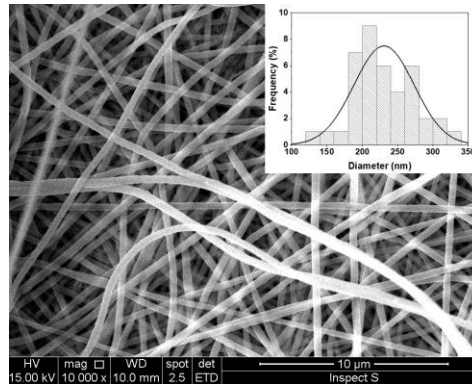
As nanofibras G25P75 exibiram um diâmetro médio de $381 \pm 68\text{nm}$, enquanto as nanofibras G50P50, um diâmetro médio de $278 \pm 41\text{nm}$. A presença de uma concentração mais alta de PCL de alta massa molar na solução do precursor G25P75 pode ter levado a um aumento na viscosidade da solução que seria responsável pelo aumento observado no diâmetro da fibra.

A Figura 12C mostra uma imagem MEV de GelMA liofilizado, em que uma estrutura de poros interconectados, com poros predominantemente arredondados e abertos, que foi observada de forma semelhante para hidrogéis de gelatina.⁶³ A análise da estrutura 3D dos hidrogéis GelMA realizada por Micro-CT mostrou que a porosidade geral atingiu um valor de 95%, enquanto o tamanho médio dos poros foi próximo a $289 \mu\text{m}$. Imagens MEV de hidrogéis preparados por fotopolimerização de misturas de pré-GelMA com mantas picadas de nanofibras G25P75 e G50P50 podem ser vistas nas Figura 12D e E, respectivamente. Imagens MEV mostram que as paredes dos poros foram decoradas com as nanofibras, levando a superfícies de poros com uma textura peculiar típica de mantas de nanofibras eletrofiadas (que também se assemelha à textura de matrizes extracelulares). Também foi possível observar que esses hidrogéis com mantas picadas de nanofibras apresentaram altos valores de porosidade e tamanhos de poros de 185 e $157 \mu\text{m}$ para GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50, respectivamente. Alta porosidade, poros interconectados e textura semelhante a MEC são favoráveis à migração celular, fixação e crescimento em um biomaterial.⁶⁰

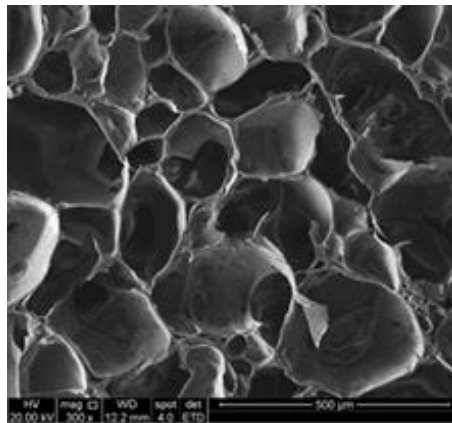
A



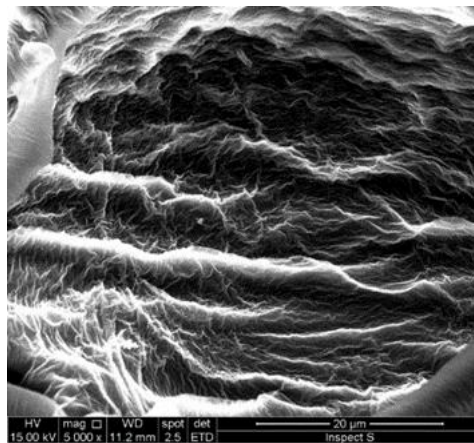
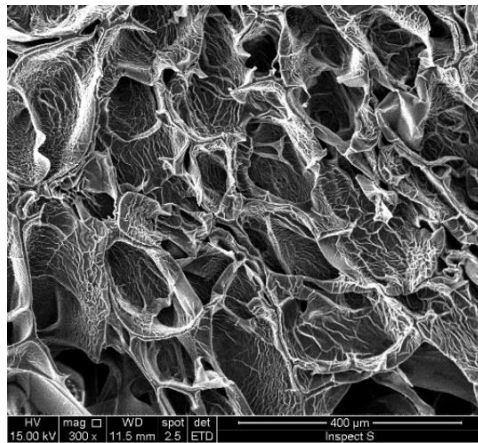
B



C



D



E

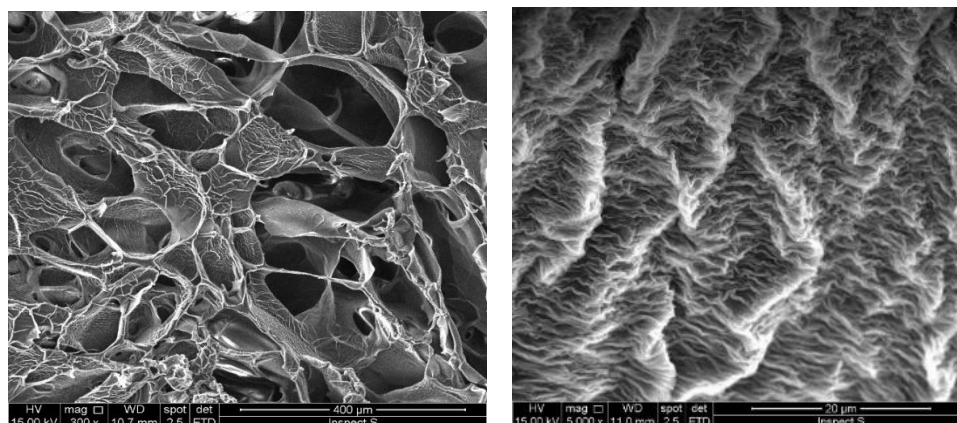
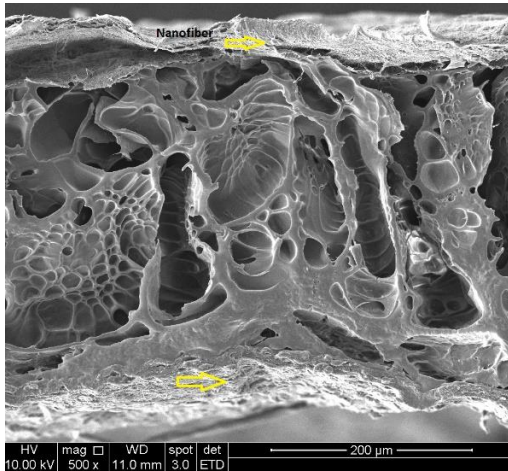


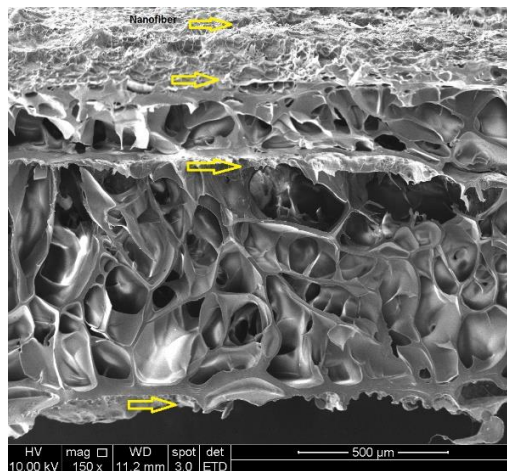
Figura 12: Imagens MEV de nanofibras eletrofiadas G25P75 (A) e G50P50 (B) e seus respectivos histogramas representando os diâmetros das fibras; (C) porosidade do hidrogel GeIMA revelada por MEV (300x); (D) porosidade da blenda GeIMA com mantas picadas de nanofibras G25P75, revelada por MEV (300x e 5000x); (E) porosidade da blenda GeIMA com mantas picadas de nanofibras G50P50, revelada por MEV (300x e 5000x).

A Figura 13 mostra imagens MEV e μ -CT de hidrogéis preparados por fotopolimerização de pilhas de mantas de nanofibras eletrofiadas G25P75 e G50P50 que foram impregnadas com pré-GeIMA (GeIMA_2 * G25P75, GeIMA_4 * G25P75, GeIMA_2 * G50P50, GeIMA_4 * G50P50). Setas nas imagens MEV revelam a presença das mantas com nanofibras eletrofiadas. Imagens de MEV mostram também que os hidrogéis exibiram alta porosidade formada por poros alongados irregulares. A presença das camadas de mantas de nanofibra pode ter alterado a dinâmica de formação dos poros durante a liofilização, levando à estabilização dos poros alongados.

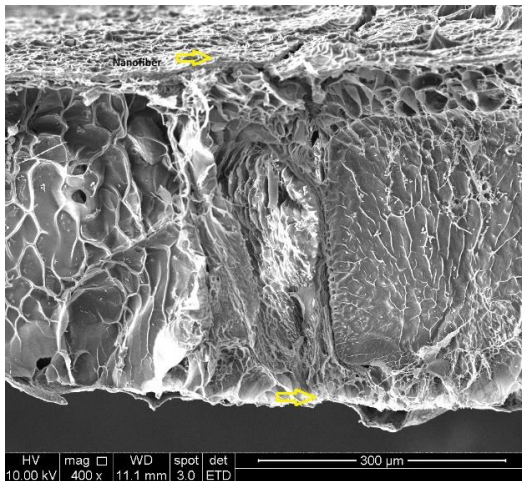
A GeIMA_2*G25P75



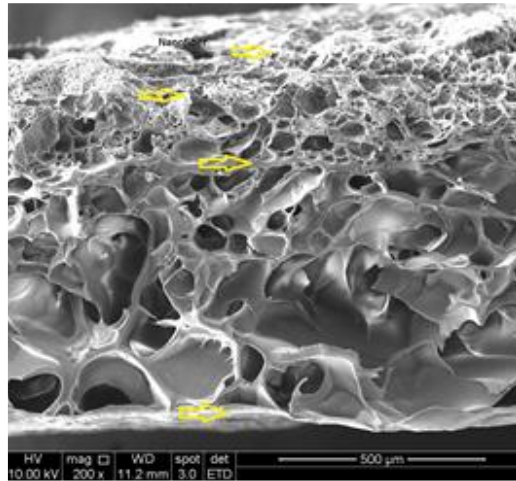
B GeIMA_4*G25P75



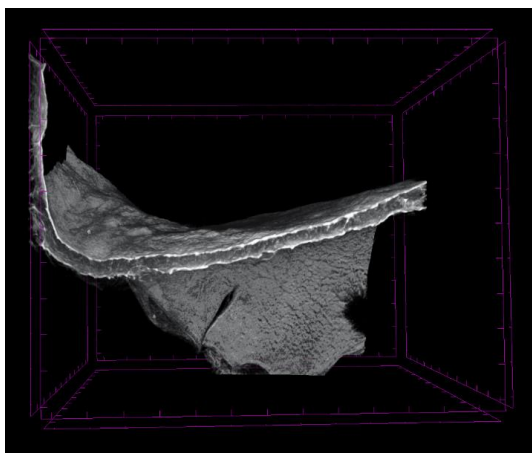
C GeIMA_2*G50P50



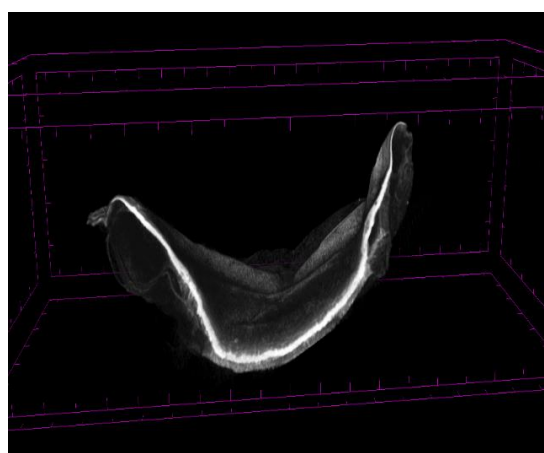
D GeIMA_4*G50P50



E GeIMA_2*G25P75



F GeIMA_4*G25P75



G GeIMA_2*G25P75



H GeIMA_4*G25P75



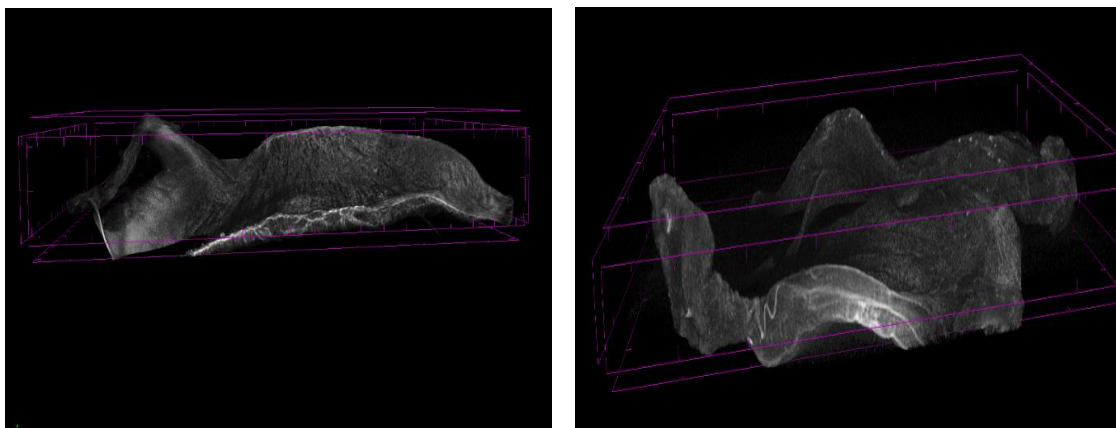


Figura 13: Pilhas de mantas de nanofibras eletrofiadas G25P75 e G50P50 em hidrogéis GelMA, reveladas por microscopia eletrônica de varredura (A, B, C e D) e por μ -cT (E, F, G e H).

4.3.2 Estrutura química de nanofibras e GelMA

A técnica ATR-FTIR permitiu a identificação dos grupos químicos típicos de PCL e GelMA que presentes nas mantas de nanofibras eletrofiadas G25P75 e G50P50. Também foi possível confirmar a presença das nanofibras nos hidrogéis com os resultados do FTIR. Na Figura 14A, o espectro de GelMA é mostrado com as bandas de absorção características devido à amida I, II e III da gelatina em 1631 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} e 1237 cm^{-1} , respectivamente. Uma banda de absorção devido às ligações C-H em 1447 cm^{-1} também foi observada.⁶⁴

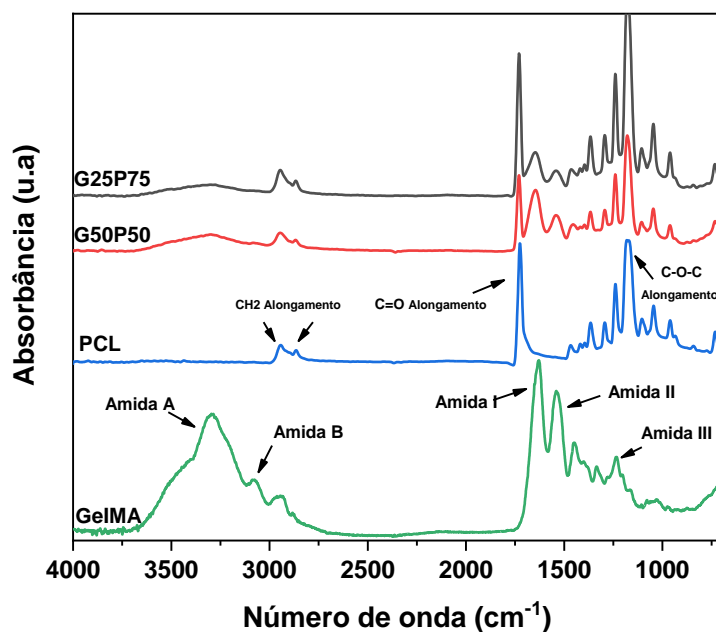
Os espectros das nanofibras (G25P75 e G50P50) mostraram bandas PCL em 1725 cm^{-1} relacionadas ao grupo carbonila⁶⁵. Também pode ser notada, em 2943 cm^{-1} e 2863 cm^{-1} , a presença de bandas de absorção referentes às vibrações dos grupos CH_2 que estão presentes nas cadeias poliméricas do PCL. Além disso, a banda de absorção em 1180 cm^{-1} pode ser atribuída às ligações C-O-C do PCL. Bandas de absorção devido às amidas I e II da gelatina (em 1631 cm^{-1} e 1542 cm^{-1}) também podem ser claramente identificadas nos espectros das nanofibras.

Comparando-se os espectros G25P75 e G50P50, Figura 14A, é possível perceber que quanto maior a proporção de GelMA, mais intensas são as bandas de absorção características deste polímero, representadas pelas amidas I e II, e menos intensas são as típicas bandas encontradas no PCL ($\text{C}=\text{O}$ em 1725 cm^{-1}). Este resultado indica que as composições projetadas das nanofibras, ou seja, G25P75 sendo mais rico em PCL do que G50P50, foram alcançadas qualitativamente.

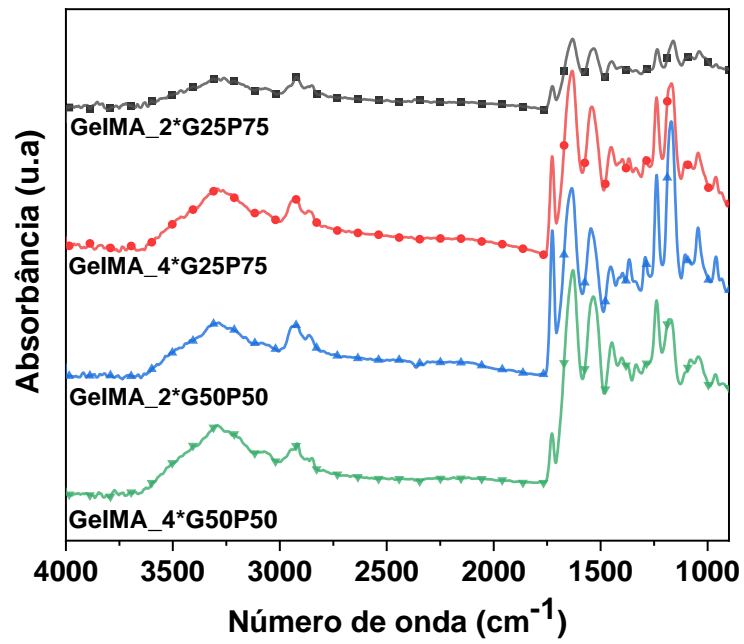
Na Figura 14B, os espectros FTIR de hidrogéis GelMA contendo pilhas de nanofibras eletrofiadas são exibidos. É possível observar as bandas características das mantas de nanofibras G25P75 e G50P50 (principalmente aquelas relacionadas ao PCL, como a banda de absorção de carbonila em 1725 cm^{-1}) nos espectros dos hidrogéis, independentemente do número de mantas de nanofibras que foi empilhado. Todos os espectros apresentaram bandas características dos dois polímeros, mas as bandas de absorção atribuídas ao PCL foram menos intensas, uma vez que as mantas de nanofibras foram diluídas em GelMA.

Na Figura 14C, comparando-se os espectros de FTIR de hidrogéis híbridos derivados de uma mistura de mantas picadas de nanofibras eletrofiadas e GelMA, são mostradas as bandas relativas ao PCL em 1725 cm^{-1} , 2943 cm^{-1} e 2863 cm^{-1} .

A



B



C

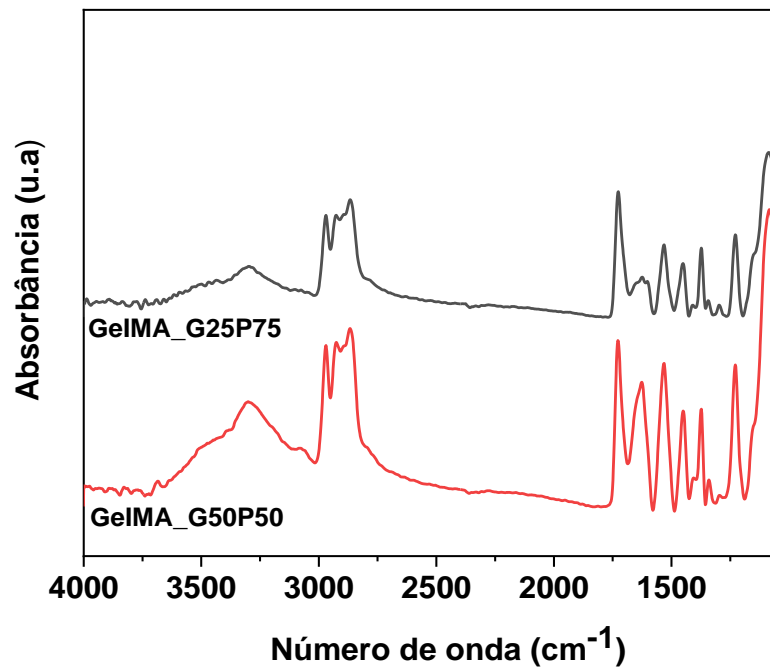


Figura 14: (A) Espectros FTIR para as mantas de nanofibras (G25P75 e G50P50) e hidrogel GelIMA e PCL. (B) Espectros dos hidrogéis com pilhas de mantas de nanofibras (G25P75 e G50P50). (C) Espectros de hidrogéis híbridos derivados de uma mistura de mantas picadas de nanofibras eletrofiadas e GelIMA.

4.3.3 Estudo DSC de nanofibras e hidrogéis híbridos

A Figura 15 mostra curvas DSC dos hidrogéis híbridos contendo pilhas de mantas de nanofibras. Os hidrogéis com mantas de nanofibras empilhadas mostraram curvas DSC com uma endoterma de fusão clara em relação ao PCL em torno de 60° C. A entalpia desta endoterma foi proporcional à quantidade de PCL nas nanofibras (ou seja, foi maior para G25P75 do que para G50P50 de mantas de nanofibras) e ao número de mantas nos hidrogéis (2 ou 4). Esses resultados comprovaram mais uma vez a presença do PCL e das nanofibras dentro dos hidrogéis.

Não foram observados eventos de fusão relacionados à gelatina, sugerindo que a formação da rede a partir da polimerização de ligações C = C enxertadas na gelatina reduziu a possibilidade de empacotamento das cadeias e cristalização de frações de gelatina.

Coimbra et al., atribuíram o deslocamento de Tm no GelMA associado à redução no comprimento e extensão das estruturas de hélice tripla, devido à interferência de grupos laterais de metacrilamida no processo de formação e estabilização dessas estruturas ⁶⁶.

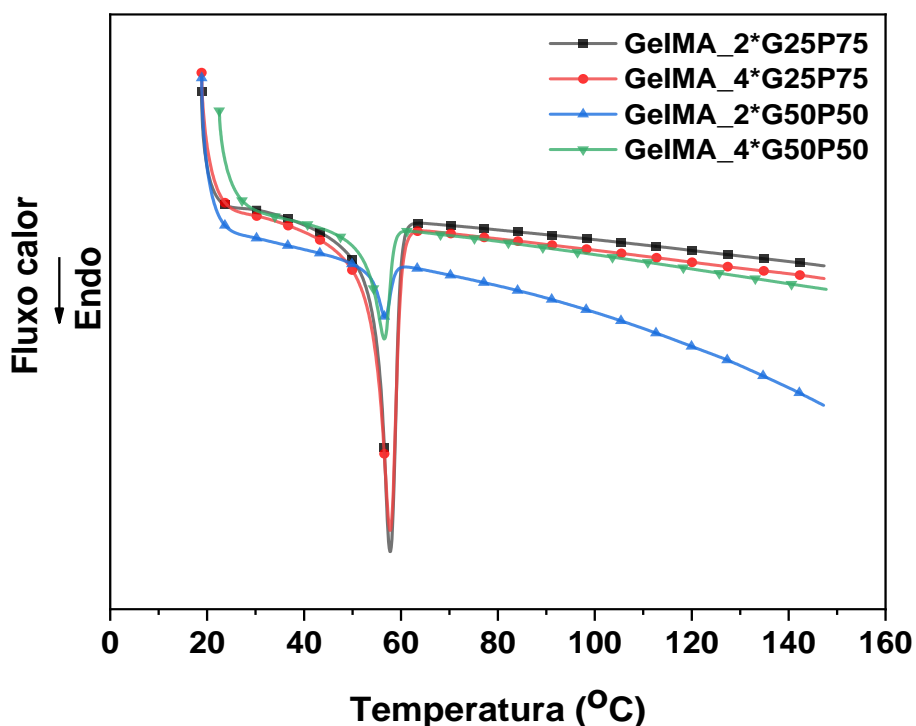
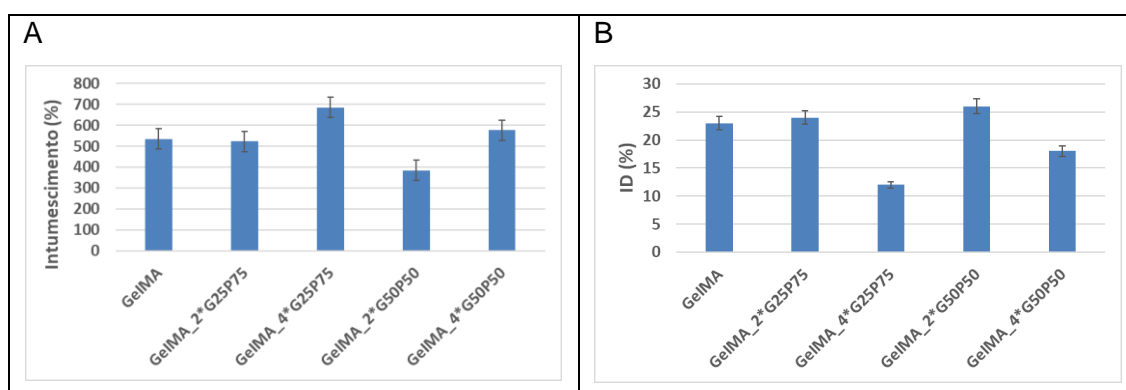


Figura 15: Curvas DSC para os hidrogéis híbridos GeIMA_2 * G25P75, GeIMA_4 * G25P75, GeIMA_2 * G50P50 e GeIMA_4 * contendo mantas de nanofibras empilhadas.

4.3.4 Comportamento de intumescimento e degradação dos hidrogéis híbridos

Os testes de intumescimento foram realizados nos hidrogéis preparados com pilhas de mantas de nanofibras, e os resultados após 24 horas de imersão em água são apresentados na Figura 16. Os resultados do comportamento de intumescimento na Figura 16A (e também nas fotos da Figura 16C) revelaram que a alta capacidade dos hidrogéis GelMA de intumescer na água (até 500%) foi mantida para os hidrogéis com mantas de nanofibras, o que significa que a presença das mantas de nanofibras não limitou a capacidade do GelMA de intumescer. Este fato pode permitir o uso dos novos hidrogéis híbridos em aplicações que requerem altos níveis de interação e expansão com água. Também foi observada uma tendência de aumentar a capacidade de intumescimento quando 4 pilhas de mantas de nanofibras foram usadas em vez de 2 pilhas de mantas de nanofibras nos hidrogéis. Este resultado pode estar possivelmente relacionado à presença de um maior número de mantas de alta área superficial que podem interagir com a água por meio de forças capilares.

O índice de degradação (ID) na Figura 16 B pode ser associado à degradação / dissolução de frações de gelatina nos hidrogéis, bem como à extração de qualquer espécie não reticulada. Os valores obtidos do índice de degradação para os hidrogéis híbridos foram semelhantes ou menores que para o GelMA puro, indicando que a presença das pilhas de mantas de nanofibras não interferiu na fotopolimerização. Além disso, os hidrogéis com 4 pilhas de mantas de nanofibra tenderam a exibir valores de índice de degradação mais baixos do que os outros hidrogéis, possivelmente devido ao fato de que esses hidrogéis com 4 pilhas de mantas terem uma concentração maior de PCL, que é um polímero de degradação lenta que pode levar a uma diminuição no processo de degradação.⁶¹



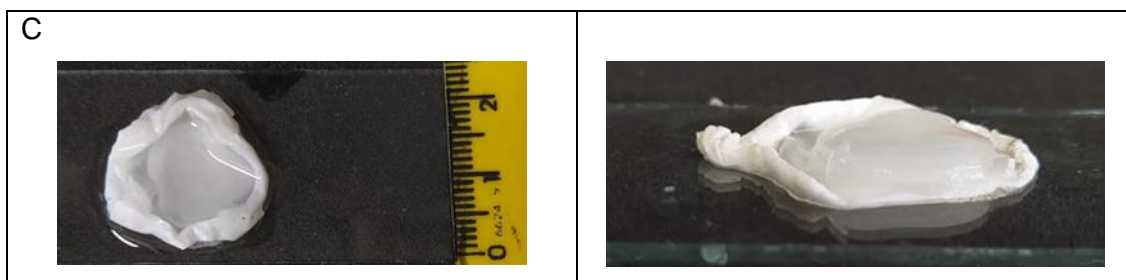


Figura 16: Comparação do inchamento dos hidrogéis GelMA, GelMA_2 * G25P75, GelMA_4 * G25P75, GelMA_2 * G50P50 e GelMA_4 * G50P50 após 24 horas de imersão em água (A) e o comportamento de degradação desses hidrogéis (B). Fotos de amostras de hidrogéis híbridos intumescidos (C).

4.3.5 Propriedades mecânicas do hidrogel híbrido

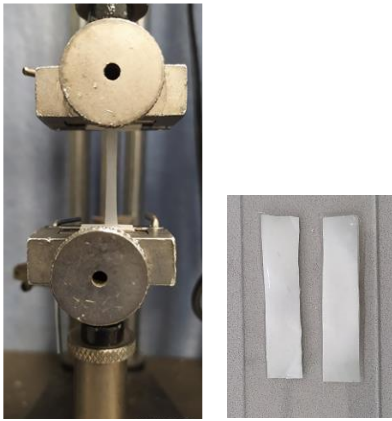
Na Figura 17A, uma foto de um hidrogel híbrido intumescido contendo pilhas de mantas de nanofibras durante um teste de tração é mostrada. É importante dizer que as amostras de GelMA puro (ou seja, hidrogel sem camadas de mantas nanofibras) se mostraram tão fracas e macias que não suportaram nem mesmo os procedimentos iniciais relacionados à fixação das amostras nas garras da máquina de teste universal. Portanto, a possibilidade de realizar testes mecânicos com hidrogéis com mantas de nanofibras empilhadas é claramente um resultado interessante que indica que os novos hidrogéis híbridos possuem propriedades mecânicas distintas e superiores.

Nas Figura 17B e C, curvas representativas de tensão-deformação e o módulo de elasticidade dos hidrogéis híbridos com pilhas de mantas de nanofibras são mostrados, respectivamente. O resultado geral revela que a incorporação de 4 pilhas de mantas de nanofibras em hidrogéis tendem a levar a valores mais elevados de módulo de elasticidade, e tensão na ruptura do que hidrogéis com 2 pilhas de mantas de nanofibras, o que indica o poderoso efeito das mantas de nanofibras eletrofiadas para reforçar os hidrogéis. Além disso, nossa estratégia de incorporar pré-GelMA nas nanofibras para melhorar a integração e as interações entre a matriz do hidrogel e as nanofibras também pode ter desempenhado um papel importante no aprimoramento das propriedades dos hidrogéis. O pré-GelMA incorporado à nanofibra pode participar da reação de fotopolimerização do hidrogel para levar a altos níveis de integração interfacial entre as nanofibras e a matriz do hidrogel. Os valores medidos de resistência (0,55 MPa), módulo de elasticidade (0,5 MPa) e deformação na ruptura (0,42 mm/mm⁻¹) para GelMA_4 * G25P75 (por exemplo) foram semelhantes ou até

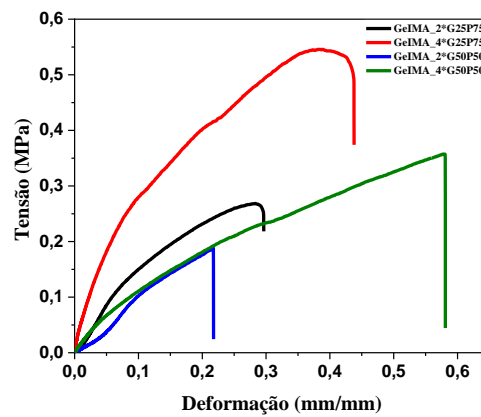
maiores do que os valores relatados por outros quando os denominados hidrogéis resistentes de rede dupla foram testados.¹⁸

As propriedades mecânicas medidas dos hidrogéis híbridos mostraram também que os hidrogéis com mantas de nanofibras ricas em PCL (G25P75) tenderam a ter mais sucesso em melhorar as propriedades mecânicas dos hidrogéis do que as mantas de nanofibras com menor teor de PCL (G50P50). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de o próprio PCL possuir propriedades mecânicas superiores às dos hidrogéis.

A



B



C

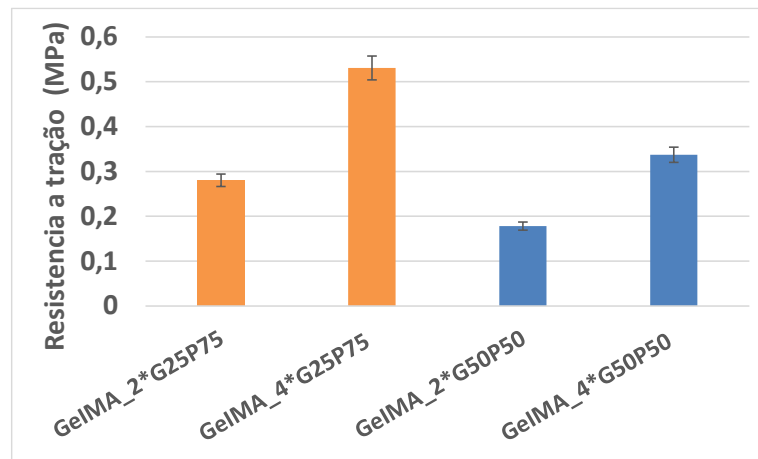
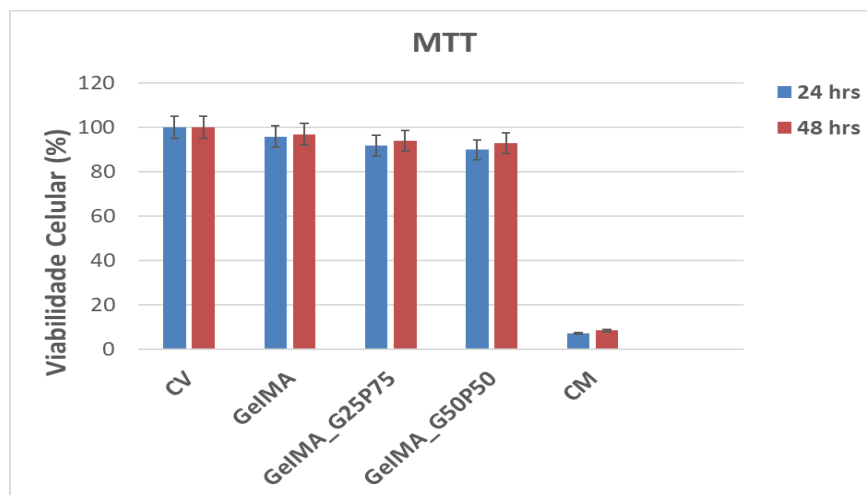


Figura 17: Hidrogéis híbridos (GeIMA_2 * G25P75) durante o ensaio mecânico (A). Curvas de tensão-deformação de hidrogéis GeIMA_2 * G25P75, GeIMA * 4_G25P75, GeIMA_2 * G50P50, GeIMA_4 * G50P50 (B). Resistência à tração obtida a partir das curvas tensão-deformação (C).

4.3.6 Viabilidade celular

Os testes de viabilidade celular realizados em hidrogéis híbridos com células incorporadas foram realizados para estudar a possibilidade dos novos hidrogéis híbridos encapsularem as células e mantê-las vivas. Os resultados da viabilidade celular pelo teste de MTT realizado após 24 e 48 horas de encapsulamento celular são apresentados na Figura 18A e mostram que os valores de viabilidade permaneceram acima de 90%, para GeIMA, e para os hidrogéis com nanofibras eletrofiadas picadas (GeIMA G25P75 e GeIMA G50P50). Não houve diferença estatística na viabilidade celular dos hidrogéis quando comparados ao grupo controle e também entre os hidrogéis investigados, ou seja, todos se mostraram atóxicos.

A



B

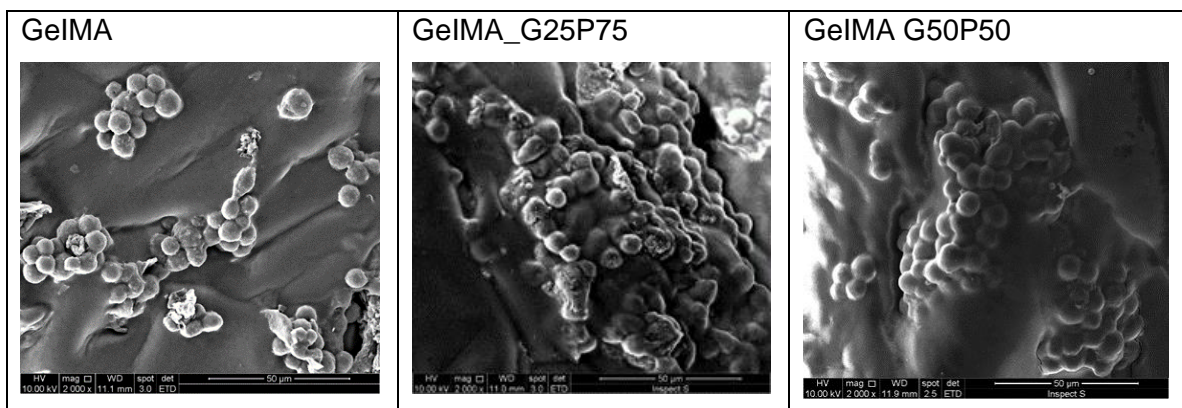


Figura 18: Resultados de viabilidade celular MTT (A) e imagens MEV (2000X) de células RKO embutidas em hidrogéis (seção transversal das amostras de hidrogel) (B)

As imagens de MEV na Figura 18B representativas da seção transversal dos hidrogéis com células incorporadas após 24 h mostram que as células incorporadas foram capazes não apenas de sobreviver, mas também de proliferar dentro dos hidrogéis. Isso foi verdade para hidrogéis puros (GelMA) e também para hidrogéis híbridos contendo mantas picadas de nanofibras eletrofiadas (GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50). Além disso, de acordo com as imagens na Figura 9B, as células RKO tenderam a proliferar mais e a começar a produzir colônias de células dentro dos hidrogéis com mantas de nanofibras do que dentro do hidrogel GelMA puro (ou seja, a densidade das células nos hidrogéis GelMA_G25P75 e GelMA_G50P50 se mostrou maior do que em GelMA). Este resultado pode ser justificado pela presença de uma textura semelhante à ECM (derivada de mantas de nanofibras eletrofiadas) que foi observada nas paredes dos poros dos hidrogéis híbridos (Figura 12D e E). Essa textura semelhante a ECM (geralmente promovida por mantas de nanofibra eletrofiadas) pode aumentar a adesão e proliferação celular.

4.4 Conclusões

Hidrogéis derivados de biomacromoléculas fotopolimerizáveis podem ser muito interessantes para uma variedade de aplicações biomédicas, pois combinam bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade com processabilidade e baixo custo. Neste trabalho, mostramos que os hidrogéis com propriedades e bioatividade aumentadas podem ser preparados integrando-se mantas de nanofibras por eletrofiação com hidrogéis fotopolimerizáveis à base de gelatina. Os resultados de MEV e micro-CT mostraram que os protocolos projetados para a preparação de hidrogel híbrido foram bem-sucedidos em alcançar os materiais planejados, ou seja, hidrogéis GelMA com mantas de nanofibras picadas e hidrogéis GelMA com pilhas de nanofibras impregnadas com GelMA. Além disso, imagens de MEV de hidrogéis de com mantas de nanofibras picadas mostraram que as paredes dos poros dos hidrogéis tinham uma textura semelhante a uma manta de nanofibras. Imagens de MEV combinadas com resultados de DSC e FTIR também demonstraram que as mantas de nanofibras baseadas em PCL com GelMA também foram obtidas conforme pretendido em termos de composição e morfologia. Os testes de intumescimento em hidrogéis foram capazes de mostrar que a presença de mantas de nanofibras dentro

dos hidrogéis não restringiu os hidrogéis a intumescer na água, sendo esse tipo de comportamento é altamente desejável para uma gama de aplicações biomédicas. Os hidrogéis híbridos com pilhas de mantas de nanofibra puderam ser testados mecanicamente enquanto intumescidos com água usando testes de tração padrão. As propriedades mecânicas avaliadas revelaram que um maior número de mantas de nanofibras nos hidrogéis levou a maiores propriedades mecânicas. A viabilidade celular não foi reduzida na presença de GelMA e nanofibras G25P75 e G50P50 sugerindo que hidrogéis e nanofibras não apresentaram citotoxicidade e também poderiam ser usados em aplicações biomédicas. As células RKO foram encapsuladas com sucesso em ambos os hidrogéis GelMA e também em hidrogéis híbridos com mantas picadas de nanofibras, sem sinais de toxicidade. As células RKO encapsuladas também foram capazes de proliferar dentro dos hidrogéis híbridos. Além disso, as imagens de seção transversal dos hidrogéis com células encapsuladas após 24 horas de cultura celular mostraram que a taxa de proliferação celular foi maior nos hidrogéis híbridos do que nos hidrogéis GelMA puros, como uma indicação de que a textura semelhante a ECM fornecida pelas mantas de nanofibras eletrofiadas poderiam ter aumentado a bioatividade do material, oferecendo locais adequados para a fixação e proliferação celular. Como conclusão final, os resultados obtidos sugerem que a combinação de nanofibras eletrofiadas com hidrogéis fotopolimerizáveis derivados de biomacromoléculas podem fornecer uma combinação única de bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade com propriedades superiores e processabilidade para permitir a expansão do uso de hidrogéis fotopolimerizáveis derivados de biomacromoléculas em um maior número de aplicações biomédicas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 Conclusões gerais

Hidrogéis de gelatina metacrilóil apresentam uma matriz propícia à proliferação de células cancerosas e a formação de organoides tumorais, e melhora da propriedade mecânica com as mudanças estruturais.

Combinação de nanofibras eletrofiadas impregnadas com o grupo metacrilóil com hidrogéis fotopolimerizáveis derivados de biomacromoléculas podem fornecer uma combinação de bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade com propriedades superiores e processabilidade para permitir a expansão do uso de hidrogéis fotopolimerizáveis derivados de biomacromoléculas em um maior número de aplicações biomédicas.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

- ✓ Melhorar a dinâmica entre a célula e a matriz;
- ✓ Adicionar diferentes proporções do rGO e aplicar diferentes estímulos elétricos para verificar uma migração ou orientação celular para reorganização celular na parede da matriz e favorecer melhora na interação celular;
- ✓ Desenvolver organoides com hidrogéis sensíveis a temperatura e ao pH para gerar hidrogéis funcionais com melhora de superfícies e relevos ajustáveis;
- ✓ Investigar a expressão gênica celular a partir do ensaio transcriptase reversa com genes endógenos verificando se não houve alteração gênica após interação célula-matriz;
- ✓ Realizar o teste *in vivo* em membrana corioalantóico (CAM) com os organoides tumorais. Incorporar vascularização em modelos tumorais com intuito de compreender a regulação das respostas às drogas das células cancerosas;
- ✓ Melhorar propriedade mecânica dos hidrogéis com incorporação de fios mais resistentes entre as camadas, e em composições que melhorem a interação entre o fio o hidrogel

REFERÊNCIAS

- (1) Holley T, Bowe GD, Campia I, Belz S, Berggren E, Janusch-Roi A, Wittwehr C, Whelan M. Accelerating progress in the replacement, reduction and refinement of animal testing through better knowledge sharing. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2016.
- (2) Burden N, Mahony C, Muller BP, Terry C, Westmoreland C, Kimber I. Aligning the 3Rs with new paradigms in the safety assessment of chemicals. *Toxicology*. 2015;330:62-6.
- (3) Raina DB, Koul R, Bangroo A, Kumar A. Fabrication temperature modulates bulk properties of polymeric gels synthesized by different crosslinking methods. *RSC Advances*. 2014;4(60):31855-73
- (4) Kuckling D, Urban MW. Synthetic and physicochemical aspects of advanced stimuli-responsive polymers. In: Urban MW, editor. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA; 2011. p.1-26
- (5) Singh J. The National Centre for The Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2012 Jan-Mar; 3(1):87–9
- (6) Schutte M, Fox B, Baradez MO, Devonshire A, Minguez J, Bokharl M, Przyborski S, Marshall D. Rat primary hepatocytes show enhanced performance and sensitivity to acetaminophen during three-dimensional culture on a polystyrene scaffold designed for routine use. *Assay Drug Dev Technol*. 2011 Oct;9(5):475-86
- (7) Santos AG, Pereira LC. Utilização de métodos alternativos à experimentação animal em pesquisa. *Resbcal*. 2016;4(1):22-31
- (8) Gurski L, Petrelli N, Jia X, Farach-Carson M. Three-dimensional matrices for anti-cancer drug testing and development. *Oncol Issues*. 2010;25:20–5
- (9) Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014 May;12(4):207–18
- (10) Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Solomon FDP. 3D cell culture systems: advantages and applications. *J of Cell Physiol*. 2015 Jan;230(1):16-26
- (11) Xinaris C, Benedetti V, Rizzo P, Abbate M, Corna D, Azzollini N, Conti S, Unbekandt M, Davies JA, Morigi M, Benigni A, Remuzzi G. In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol*. 2012 Nov;23(11):1857–68
- (12) Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1586-97

- (13) Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2014 Oct;9(10):2329–40
- (14) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers In 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394–424
- (15) McGranahan N, Swanton C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):613–28
- (16) Booi TH, Klop MJD, Yan K, Szántai-Kis C, Szokol B, Orfi L, Water BV, Keri G, Price LS. Development of a 3D Tissue Culture-Based High-Content Screening Platform That Uses Phenotypic Profiling to Discriminate Selective Inhibitors of Receptor Tyrosine Kinases. *J Biomol Screen.* 2016 Oct;21(9):912–22
- (17) Gaharwar AK, Avery RK, Assmann A, Paul A, Mckinley GH, Khademhosseini A, Olsen BD. Shear-thinning nanocomposite hydrogels for the treatment of hemorrhage. *ACS Nano.* 2014;8(10):9833-42
- (18) Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology *Anat Rec.* 1954 May;119(1):11-33
- (19) Hamidl M, Azadi A, Rafiei P. Hidrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Dec 14;60(15):1638-49
- (20) Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.* 3ª edição. São Paulo: Elsevier, 2012.
- (21) Mccuskey RS. The Hepatic Microvascular system in health and its response to toxicants. *Anat. Rec (Hoboken).* 2008 Jun;291(6):661–71
- (22) Sajkiewicz P, Kołbuk D. Electrospinning of gelatin for tissue engineering – molecular conformation as one of the overlooked problems. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2014;25(18):2009-22
- (23) Kolesky DB, Truby RL, Gladman AS, Busbee TA, Homan KA, Lewis JA. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv. Mater.,* 2014 May 21;26(19):3124–30
- (24) Gao G, Yonezawa T, Hubbell K, Dai G, Cui X. Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging. *Biotechnol J.* 2015 Oct;10(10):1568–77
- (25) Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials.* 2015 Dec;73:254–71

- (26) Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*. 2010 Jul;31(21):5536-44
- (27) Aubin H, Nichol JW, Hutson CB, Bae H, Sieminski AL, Cropek DM, Akhyari P, Khademhosseini A. Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels. *Biomaterials*, 2010 Sep;31(27):6941-51
- (28) Zhu M, Wang Y, Ferracci G, Zheng J, Cho NJ, Lee BH. Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. *Sci Rep*. 2019 May 3;9(1):6863
- (29) Krishnamoorthy S, Noorani B, Xu C. Effects of encapsulated cells on the physical–mechanical properties and microstructure of gelatin methacrylate hydrogels. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 12;20(20):5061
- (30) Shin SR, Aghaei-Ghareh-Bolagh B, Dang TT, Topkaya SN, Gao X, Yang SY, Jung SM, Oh JH, Dokmeci MR, Tang X, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered and mechanically tunable hybrid hydrogels of gelatin and graphene oxide. *Adv Materials*, 2013 Sep;25(44):6385-91
- (31) Dufresne A. *Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials*. Berlin: De Gruyter; 2012. 460p
- (32) Eichhorn SJ. Cellulose nanowhiskers: Promising materials for advanced applications. *Soft Matter*. 2011;7(2):303-15
- (33) Elnakady YA, AlRez MF, Fouad H, Abuelreich S, Albarrag AM, Mahmood A, Alothman OY, Elsarnagawy T, Ansari SG. Vascular Tissue Engineering using Polycaprolactone Nanofibrous Scaffolds Fabricated via Electrospinning. *Sci Adv Materials*. 2015;7(3):407–13 Disponível em https://www.researchgate.net/publication/276260081_Vascular_Tissue_Engineering_Using_Polycaprolactone_Nanofibrous_Scaffolds_Fabricated_via_Electrospinning
- (34) Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*. 2016 Apr; 86:68-82.
- (35) Nuciforo S, Fofana I, Matter MS, Blumer T, Calabrese D, Boldanova T, Piscuoglio S, Wieland S, Ringnalda F, Schwank G, Terracciano LM, Ng CKY, Heim MH. Organoid models of human liver cancers derived from tumor needle biopsies. *Cell Rep*. 2018 Jul 31;24(5)1363–76
- (36) Maenhoudt N, Charlotte D, Boretto M, Jan Z, Heremans R, Boeckx B, Hermans F, Arijs I, Cox B, Nieuwenhuysen EV, Vergote I, Rompuy ASV, Lambrechts D, Timmerman D, Vankelecom H. Developing organoids from ovarian cancer as experimental and preclinical models. *Stem Cell Reports*. 2020 Apr 14;14(4):717–29.
- (37) Thakuri PS, Liu C, Luker GD, Tavana H. Biomaterials-based approaches to tumor spheroid and organoid modeling. *Adv. Healthc Mater*. 2017 Dec;7(6):e1700980.

- (38) Huang J, Jiang Y, Ren Y, Liu Y, Wu X, Li Z, Ren J. Biomaterials and biosensors in intestinal organoid culture, a progress review. *J Biomed Mater Res A*. 2020 May; 108(7):1501-8
- (39) Dong Z, Yuan Q, Huang K, Xu W, Liu G, GU Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. *RSC Adv*. 2019 Jun 4;9(31):17737-44
- (18(40) Pomari AAN, Montanheiro TLA, Siqueira CP, Silva RS, Tada DB, Lemes AP. Chitosan hydrogels crosslinked by genipin and reinforced with cellulose nanocrystals: production and characterization. *J Compos Sci*. 2019;3(84):1-12
- (41) Gu L, Li T, Song X, Yang X, Li S, Chen L, Liu P, Gong X, Chen C, Sun L. Preparation and characterization of methacrylated gelatin/bacterial cellulose composite hydrogels for cartilage tissue engineering. *Regen Biomater*. 2020 Mar;7(2): 195–202
- (42) Celikkin N, Mastrogiacomo S, Walboomers XF, Swieszkowski W. Enhancing X-ray attenuation of 3D printed gelatin methacrylate (GelMA) hydrogels utilizing gold nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Polymers*. 2019 Feb;11(2):367
- (43) Grenier J, Duval H, Barou F, Lv P, David B, Letourneur D. Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta Biomater*. 2019 Aug;94:195-203
- (44) Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 May;282(5):947–70
- (45) Sun M, Sun X, Wang Z, Guo S, Yu G, Yang H. Synthesis and properties of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels and their recent applications in load-bearing tissue. *Polymers*. 2018 Nov;10(11):1290
- (46) Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2007;39(8):549-59. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17687489/>
- (47) Mertz G, Fouquet T, Becker C, Ziarelli F, Ruch D. A methacrylic anhydride difunctional precursor to produce a hydrolysis-sensitive coating by aerosol-assisted atmospheric plasma process. *Plasm Processes and Polymers*. 2014;11(8):728-33.
- (48) Mamaghani M, Sheykhani M, Sadeghpour M, Tavakoli F. An expeditious one-pot synthesis of novel bioactive indole-substituted pyrido[2,3-d] pyrimidines using $Fe_3O_4@SiO_2$ -supported ionic liquid nanocatalyst. *Monatsh Chem*. 2018;149(8):1437-46.
- (49) Liang Y, Zhao X, Hu T, Chen B, Yin Z, Ma PX, Guo B. Adhesive hemostatic conducting injectable composite hydrogels with sustained drug release and photothermal antibacterial activity to promote full-thickness skin regeneration during wound healing. *Small*. 2019 Mar;15(12):e1900046.

- (50) Miri AK, Hosseinabadi HG, Cecen B, HassanS, Zhang YS. Permeability mapping of gelatin methacryloyl hydrogels. *Acta Biomater.* 2018 Sep 1;77:38-47
- (51) Achterberg VF, Buscemi L, Diekmann H, Smith-Clerc J, Schwengler H, Meister JJ, Wenck H, Gallinat S, Hinz B. The nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. *J Invest Dermatol.* 2014 Jul;134 (7):1862-72.
- (52) Magno V, Meinhardt A, Werner C. Polymer hydrogels to guide organotypic and organoid cultures. *Adv Funct Mater.* 2020;30(48):1-46. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1002/adfm.202000097>
- (53) Zhu W, Harris BT, Zhang LG. Gelatin methacrylamide hydrogel with graphene nanoplatelets for neural cell-laden 3D bioprinting. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Bio Soc.* 2016 Aug;2016:4185-88.
- (54) Benítez JM, Montáns FJ. The mechanical behavior of skin: structures and models for the finite element analysis. *Computers & Structures.* 2017 Oct 1;(190):75-107.
- (55) Ahmed EM. Hydrogel: preparation, characterization and applications: a review. *J Adv Res.* 2015 Mar;6(2):105-21. Disponível em <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2090123213000969?token=08155891609AAD87B28B606184DA9CCF7F46A61DCB7D5A60D98C28F42FDF480E8DDB021349D266D967412D17426C6A1B&originRegion=us-east-1&originCreation=20220702154754>
- (56) Glazer PJ, Leuven J, An H, Lemay SG, Mendes E. Multi-stimuli responsive hydrogel cilia. *Adv Funct Mater.* 2013 Jan 18;23(23):2964-70
- (57) Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rc strategy. *Lab Anim (NY)* 2017 Mar 22; 46(4):152-6
- (58) Li J, Gao L, Xu R, Ma S, Ma Z, Lui Y, Wu Y, Feng L, Cai M, Zhou F. Fibers reinforced composite hydrogels with improved lubrication and load-bearing capacity. *Friction* 2022;10(1): 54-67. Disponível <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s40544-020-0389-9.pdf>
- (59) Shin H, Olsen BD, Khademhosseini A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials* 2012 Apr;33(11):3143-52. Disponível <https://core.ac.uk/reader/78064630>
- (60) Wang Z, Tian Z, Menard F, Kim K. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. *Biofabrication.* 2017 Aug 21;9(4):044101 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28770808/>
- (61) Kai D, Probhakaran MP, Stahl B, Eblenkamp M, Wintermantel E, Ramakrishna S. Mechanical properties and in vitro behavior of nanofiber–hydrogel composites for tissue engineering applications. *Nanotechnology.* 2012 Mar 9;23(9):095705 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22322583/>

- (62) Rameshbabu AP, Datta S, Bankoti K, Subramani E, Chaudhury K, Lalzawmliana V, Nandi SK, Dhara S. Polycaprolactone nanofibers functionalized with placental derived extracellular matrix for stimulating wound healing activity. *J Mater Chemi B*. 2018;6:6767-80 Disponível em https://www.researchgate.net/publication/328056255_Polycaprolactone_Nanofibers_Functionalized_with_Placental_Derived_Extracellular_Matrix_for_Stimulating_Wound_Healing_Activity
- (63) Gu L, Li T, Song X, Yang X, Li S, Chen L, Liu P, Gong X, Chen C, Sun L. Preparation and characterization of methacrylated gelatin/bacterial cellulose composite hydrogels for cartilage tissue engineering. *Regenerative Biomaterials*. 2020:195–202 Disponível em https://pdfs.semanticscholar.org/6950/0123ac8d250da36308b4857998f364c961cf.pdf?_ga=2.184149734.1787544156.1656949368-1918666203.1656949368
- (64) Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg AJW, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-methacryloyl hydrogels: towards biofabrication-based tissue repair. *Trends in Biotechnology*. 2016 May;34(5):394–407 Disponível em <https://daneshyari.com/article/preview/36864.pdf>
- (65) Souza SOL, Guerra MCA, Heneine LGD, Oliveira CR, Junior ASC, Fialho SL, Oréface RL. Biodegradable core-shell electrospun nanofibers containing bevacizumab to treat age-related macular degeneration. *J Mater Sci Med*. 2018 Nov 3;29(11):173 Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30392064/>
- (66) Coimbra P, Gil MH, Figueiredo M. Tailoring the properties of gelatin films for Drug delivery applications: influence of the chemical cross-linking method. *Inter J Bio Macrom*. 2014 Sep; 7010-9, DOI: [org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.021](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.021)
- (67) Sedlacík T, Nonoyama T, Guo H, Kiyama R, Nakajima T, Takeda Y, Kurokawa T, Gong JP. Preparation of tough double- and triple-network supermacroporous hydrogels through repeated cryogelation. *Chemistry of Materials* 2020;32(19):8576-86. Disponível em https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/82930/2/Chemistry%20of%20Materials_2020.pdf

Apêndice A

No intuito de validar a eficiência do sistema tridimensional como um possível organoide tumoral, foram repetidos os mesmos protocolos de incorporação das células RKO nos hidrogéis GelMA com outra linhagem celular. Foram incorporados ao GelMA NB e GelMA NA a linhagem tumoral de ovário OV-90 (ATCC® CRL-11732™), com 4×10^5 célula/mL em placas de 12 poços, em meio 199 contendo HEPES, Piruvato de Sódio e SFB15%.

Foram realizados os ensaios de viabilidade celular por LIVE DEAD, registro das imagens das células no hidrogel pelo Microscópio óptico, microscópio de fluorescência e realização de lâminas histológicas com a coloração HE.

Os resultados de viabilidade celular, representados na figura A1 foram acima de 80% para o GelMA NB OV-90 e GelMA NM OV-90. Não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle. As imagens obtidas ao microscópio óptico (MO), pela marcação LIVE DEAD e pelo corte histológico com coloração por hematoxilina eosina (HE), representadas nas figuras A2 e A3, indicaram a presença de células viáveis nos hidrogéis GelMA. Foi observado um aumento na densidade celular após 48 horas de cultivo, quando comparado ao tempo de 24 horas. Este resultado indica que as células incorporadas foram capazes de aderir e proliferar dentro dos hidrogéis devido a um ambiente altamente poroso e quimicamente adequado que se assemelha à matriz extracelular fornecida pelo GelMA.

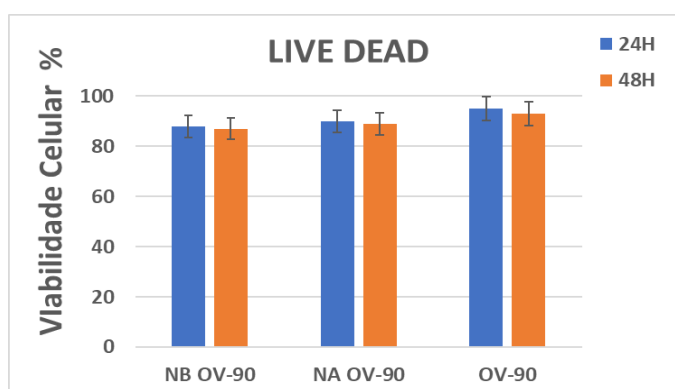


Figura A1: Viabilidade celular OV-90 por Live Dead, no período de 24 e 48 horas em estufa à 37 °C.

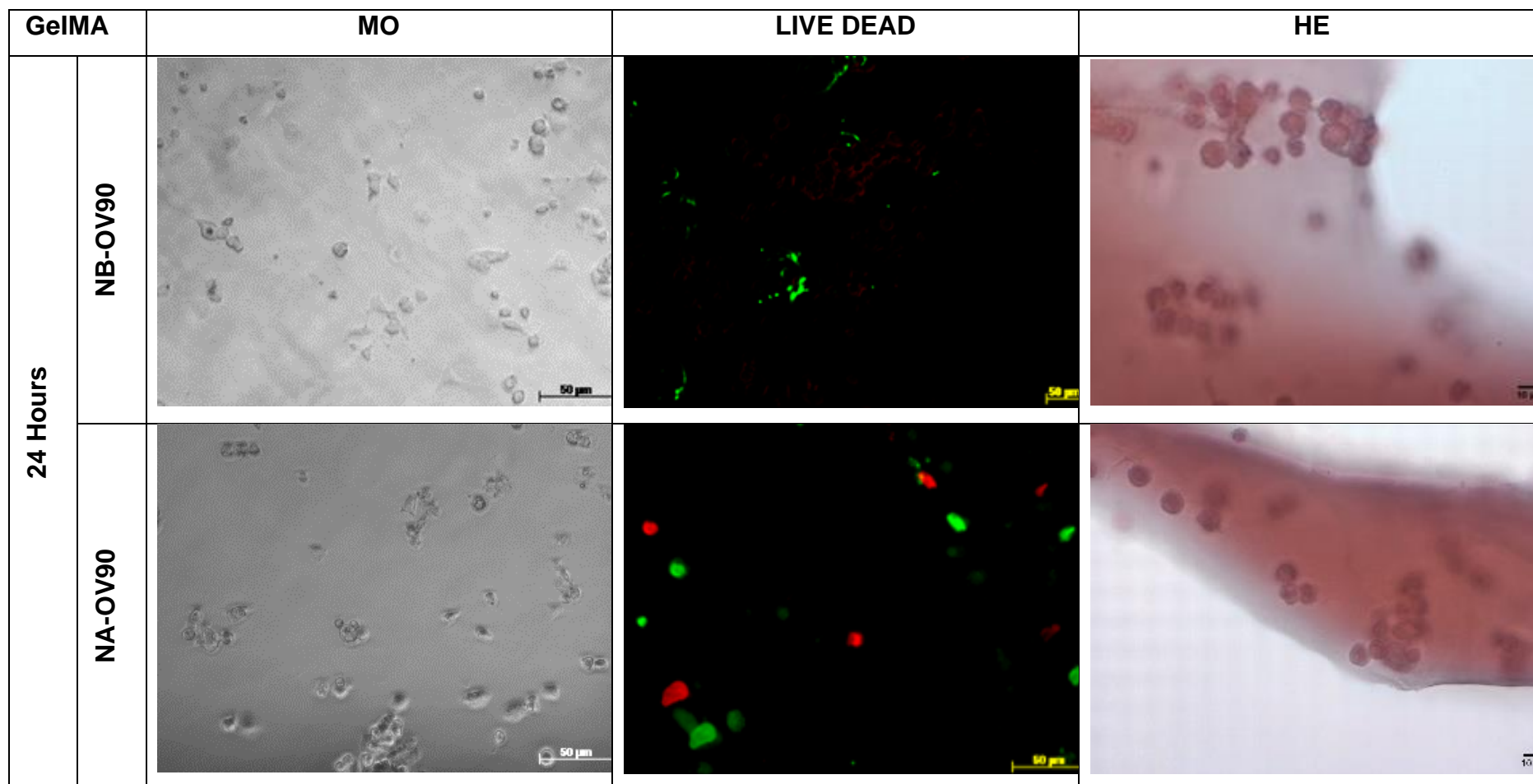


Figura A2. Imagens da célula RKO nos hidrogéis GeIMA NB e GeIMA NA RKO em 24 h em estufa a 37° C, obtidas ao microscópio óptico (MO), pela marcação LIVE DEAD e pelo corte histológico com coloração por hematoxilina eosina (HE).

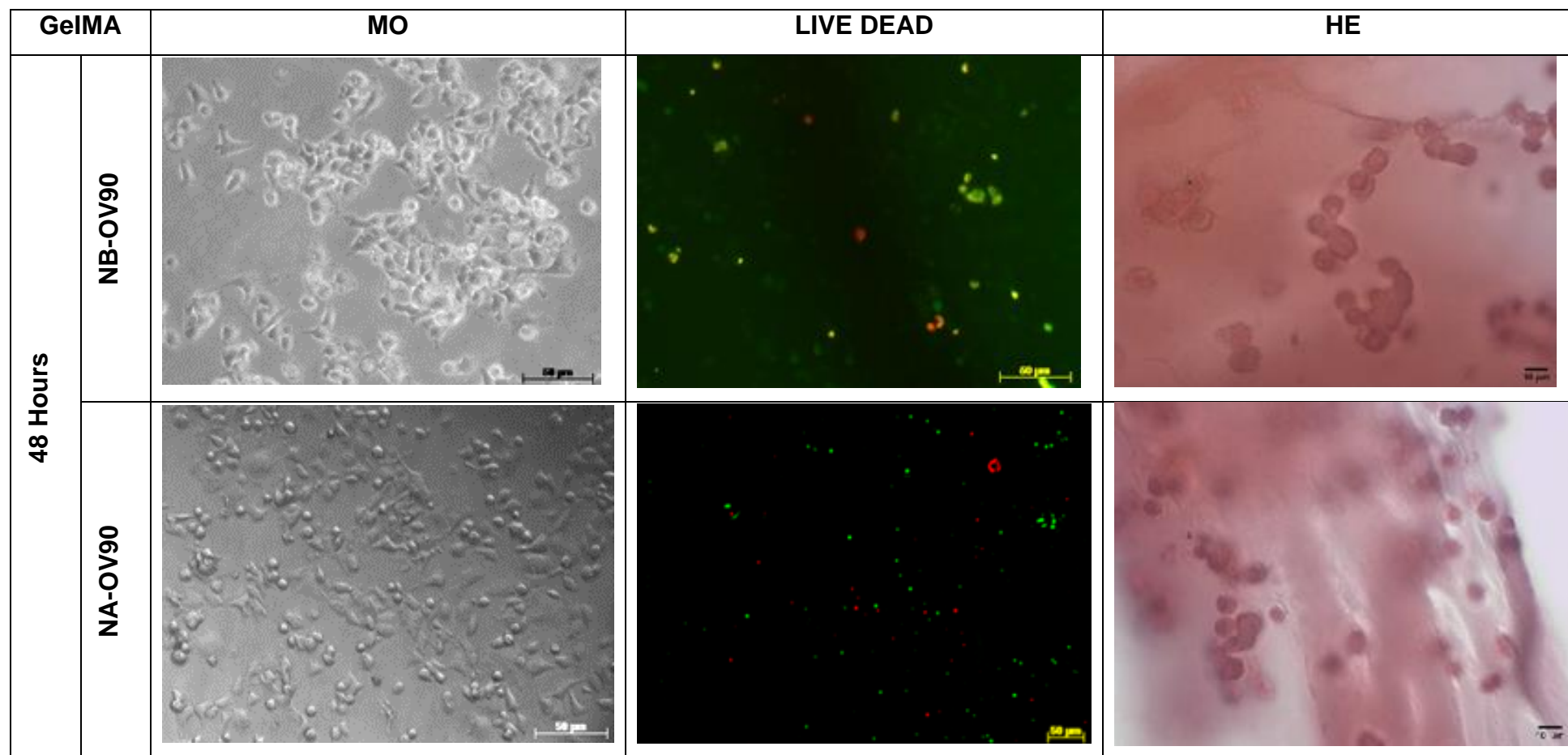


Figura A3. Imagens da célula RKO nos hidrogéis GeIMA NB e GeIMA NA RKO em 48h em estufa a 37° C, obtidas ao microscópio óptico (MO), pela marcação LIVE DEAD e pelo corte histológico com coloração por hematoxilina eosina (HE).