

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Mestrado em Odontologia

Caio Salinas Troncoso

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE HIDROGÉIS
DE GELATINA METACRILADA BIOIMPRESSA**

São Paulo

2023

Caio Salinas Troncoso

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE HIDROGÉIS
DE GELATINA METACRILADA BIOIMPRESSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro — UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Gonçalves

São Paulo

2023

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Universidade Santo Amaro – UNISA

T768a Troncoso, Caio Salinas.
Análises físico-químicas e biológicas de hidrogéis de
gelatina metacrilada bioimpressa / Caio Salinas Troncoso. – São
Paulo, 2023.
53 p. : il., color.
Orientador: Prof. Dr. Flávia Gonçalves.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Santo
Amaro, 2023.

1. GelMA. 2. Proliferação celular. 3. Reologia. I. Gonçalves,
Flávia, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

CDD 617.6

Elaboradora pela Bibliotecária: Milena Braz Martins CRB-8/9974

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E
COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

Caio Salinas Troncoso

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE HIDROGÉIS
DE GELATINA METACRILADA BIOIMPRESSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Santo Amaro — UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Gonçalves

São Paulo, de de

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.....

Prof. Dr

Prof. Dr

Conceito Final

Dedico esta dissertação a Deus, guia constante em minha jornada acadêmica. Agradeço pela força que Ele me concedeu, pela clareza em momentos de dúvida e pela graça que permeou cada passo desta jornada.

À minha família, cujo amor e apoio foram alicerces fundamentais para a realização deste trabalho. Aos meus pais, cujo sacrifício e exemplo moldaram meu caráter e aspirações e aos meus irmãos, que me inspiram a perseguir a excelência.

Que esta dissertação seja um testemunho de minha gratidão a Deus e à minha família, e que ela contribua, de alguma forma, para o bem da comunidade acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que contribuíram para o sucesso desta dissertação.

À minha família, que esteve presente durante toda essa jornada.

À minha orientadora, Flávia Gonçalves, pela orientação perspicaz, suas contribuições valiosas e insights críticos foram fundamentais para a qualidade deste trabalho.

Ao professor Wilson Sendyk, pelo incentivo e cuidado, e ao corpo docente pelo ambiente estimulante de aprendizado que proporcionaram.

Ao Luiz Henrique Catalani, pela generosidade em fornecer o espaço e a equipe necessários para a realização deste projeto, e à Amanda Araujo Domingues que disponibilizou seu tempo, compartilhando seu conhecimento e experiência.

À sra. Thaís Reis Machado, coordenadora dos Laboratórios Multidisciplinares da Universidade Santo Amaro, por viabilizar o uso da infraestrutura para execução deste estudo.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa que me foi concedida.

À Universidade Santo Amaro (UNISA) e seu centro de pesquisa, por tornar toda essa jornada possível.

Aos amigos e colegas que caminharam ao meu lado, celebrando triunfos e enfrentando desafios, agradeço a camaradagem e o apoio.

Por fim, agradeço a Deus.

“Não é porque sou um cientista que não acredito em outras forças, [...], muito pelo contrário, algumas coisas que encontrei em minha vida não podem ser explicadas de forma tão lógica.”

Victor Salinas Troncoso – *A Maldição de Jericó*.

RESUMO

Introdução: A bioengenharia tecidual visa desenvolver substitutos de órgãos e tecidos humanos em laboratório. Isso envolve o uso de biomateriais, células e fatores de crescimento. A seleção adequada do biomaterial é essencial para garantir a adesão, diferenciação e proliferação celular. O hidrogel de gelatina Metacrilato (GelMA) é um biomaterial bastante estudado devido às suas propriedades biológicas e físicas, especialmente para a bioimpressão.

Objetivos: os objetivos deste estudo foram: (1) sintetizar hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações; (2) avaliar as propriedades reológicas (viscosidade, tixotropia e fotoreologia) dos hidrogéis de GelMA; e (3) avaliar a adesão e proliferação de células derivadas do ligamento periodontal humano sobre os hidrogéis de GelMA bioimpressos.

Materiais e Métodos: foi sintetizada gelatina metacrilada (GelMA) pela reação de gelatina com anidrido metacrílico. Hidrogéis com 0.5% lítio fenil-2,4,6-trimetilbenzofosfinato (fotoiniciador) e 5, 10, 15% e 20% de GelMA foram confeccionados. Células foram isoladas e dispersas nos hidrogéis de GelMA na concentração de 10^5 células/mL. A proliferação celular nos constructos foi mensurada pelo ensaio alamarBlue com 24 e 72 horas de semeadura e ensaio de CCK-8 com 24 horas. Para confirmar a metacrilização da gelatina, após a liofilização o produto da síntese foi submetido a análise de ressonância magnética de prótons ^1H RMN. Os ensaios mecânicos, reológicos e fotoreológicos foram mensurados em um reômetro com uma geometria de cone e placa. Os dados foram submetidos a ANOVA de fator único, teste de Tukey e análise de correlação de Pearson ($\alpha=0,05$).

Resultados: O grau de metacrilização foi calculado em 82%. A concentração de 5% GelMA apresentou uma viscosidade cerca de 1 a 4 ordens de grandeza menor do que as demais concentrações. A área de histerese dos hidrogéis se mostrou maior com o aumento da concentração de GelMA. A redução de alamarBlue mostrou resultados semelhantes entre os grupos, assim como a redução de CCK-8.

Conclusão: A análise confirmou a metacrilização bem-sucedida da gelatina. A viscosidade e as propriedades reológicas dos hidrogéis de GelMA variam de acordo com a concentração do GelMA, porém essa concentração não mostrou diferença significativa na proliferação celular. Logo, o hidrogel a 20% GelMA, que apresentou maior tixotropia, é indicado o mais promissor para avaliação de bioimpressão.

Palavras-chave: GelMA. Proliferação celular. Reologia.

ABSTRACT

Introduction: Tissue bioengineering aims to develop substitutes for human organs and tissues in the laboratory. This involves the use of biomaterials, cells and growth factors. Proper selection of the biomaterial is essential to ensure cell adhesion, differentiation and proliferation. Methacryloyl gelatin hydrogel (GelMA) is a biomaterial under study due to its biological and physical properties, especially for bioprinting. **Aim:** the objectives of this study are: (1) to synthesize GelMA hydrogels in different concentrations; (2) evaluate the rheological properties (viscosity, thixotropy and photorheology) of GelMA hydrogels; and (3) evaluate the adhesion and proliferation of cells derived from the human periodontal ligament on GelMA hydrogels. **Method:** methacrylated gelatin (GelMA) will be synthesized by reacting gelatin with methacrylic anhydride. Hydrogels with 0.5% lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate and 5%, 10%, 15% and 20% GelMA will be synthesized. Cells were isolated and dispersed in GelMA hydrogels at a concentration of 10^5 cells/mL. Cell viability in the constructs will be measured by the alamarBlue assay at 24 and 72 hours of seeding, and CCK-8 assay at 24 hours. To confirm the methacrylation of gelatin, after lyophilization, the synthesis product will be subjected to ^1H NMR proton magnetic resonance analysis. Mechanical, rheological and photorheological tests will be measured in a rheometer with a cone and plate geometry. The data will be subjected to single-factor ANOVA, Tukey test and Pearson correlation analysis ($\alpha=0.05$). **Results:** The degree of methacrylyl was calculated as 82.2% and 82%. The 5% GelMA concentration presented a viscosity approximately 1 to 4 orders of magnitude lower than the other concentrations. The hysteresis area of the hydrogels was found to be larger with increasing GelMA concentration. The reduction in alamarBlue showed similar results between groups, as did CCK-8 reduction. **Conclusion:** The analysis confirmed the successful methacrylization of gelatin. The viscosity and rheological properties of GelMA hydrogels vary according to the concentration of GelMA, but this concentration did not show a significant difference in cell viability. Therefore, the 20% GelMA hydrogel, which showed greater thixotropy, is indicated as the most promising for bioprinting evaluation.

Keywords: GelMA. Cell proliferation. Rheology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas do GeIMA em diferentes concentrações.	17
Tabela 2: Índices K e η calculados para os hidrogéis de GeIMA em diferentes concentrações.	38
Tabela 3: Média e desvio-padrão do tempo de reticulação (s) dos hidrogéis após a fotoativação com lâmpada UV de 385nm.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) reômetro do tipo cone/placa utilizado nas análises reológicas; (B) Análise de fotoreologia, mostrando o cone em contato com a placa e o hidrogel sendo irradiado por baixo da placa.	29
Figura 2: Ressonância magnética de prótons (1H RMN). (A) Espectro de 1H RMN da gelatina;. Espectro de 1H RMN da GEL-MA;. (C) Espectro de 1H RMN da Gelatina(azul) e da GEL-MA(vermelho) sobrepostos.	36
Figura 3: Viscosidade média (Pa.s) dos hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações em função da taxa de cisalhamento (1/s).	37
Figura 4: Média e desvio-padrão da área de histerese (Pa.s) dos hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).	38
Figura 5: Correlação linear direta entre a área de histerese (Pa.s) e a concentração de GelMA.	39
Figura 6: Média e desvio-padrão do percentual de redução do alamarBlue por células derivadas do ligamento periodontal humano em função da concentração de GelMA em 24 e 72h de cultivo.	40
Figura 7: Média e desvio-padrão da absorbância dada pelo ensaio CCK-8 em blocos bioimpressos com células derivadas do ligamento periodontal humano em função da concentração de GelMA em 24h.	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISAO LITERATURA	15
2.1	GelMA	15
2.2	Propriedades físico-químicas	15
2.3	Reologia.....	19
2.4	Estudos <i>in vitro</i>	19
2.5	Fotoiniciador.....	22
2.6	Estudos <i>in vivo</i>	23
3	OBJETIVO	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Síntese da Gelatina-Metacrilato	27
4.2	Síntese do Hidrogel	28
4.3	Análises Reológicas	28
4.4	Isolamento de Células Derivadas do Ligamento Periodontal Humano (PDLC) 31	
4.5.1	Ensaio de Viabilidade Celular (AlamarBlue).....	32
4.5.2	Ensaio de Viabilidade Celular (CCK-8)	33
4.6	Análise Estatística	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Síntese e caracterização do GelMA.....	35
5.2	Propriedades reológicas	37
5.3	Análises Biológicas	40
5.3.1	Adesão e Proliferação celular - AlamarBlue	40
5.3.2	Adesão e proliferação celular - CCK-8	41
6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP	51

1 INTRODUÇÃO

A bioengenharia tecidual contempla diversas áreas do conhecimento científico, sendo responsável pelo desenvolvimento de substitutos de órgãos e tecidos humanos realizados em laboratório, bem como de sua regeneração e, portanto, de melhorias estéticas e funcionais (1). Desta forma, seu desenvolvimento está atrelado diretamente a evolução da medicina regenerativa.

A engenharia dos tecidos está fundamentada em um tripé composto pela matriz de suporte celular (biomaterial), pelas células, e pelos fatores de crescimento (2). O biomaterial deve servir de suporte para adesão, diferenciação e proliferação celular (2). Características estas, determinadas em função da topografia, da composição química, da estrutura e da energia de superfície do tecido alvo (2). As características ideais de uma matriz de suporte celular para engenharia tecidual são: estruturas tridimensionais, sólidas, que fornecem sítios para adesão e crescimento celular; porosidades em tamanho e quantidade suficiente para permitir a troca de metabólitos com o meio; taxa de degradação compatível com a taxa de neoformação tecidual; e propriedades mecânicas compatíveis com as solicitadas ao tecido alvo (3).

No campo médico odontológico, pode-se destacar o uso da bioimpressão, que se assemelha a impressão 3D, mas consiste na impressão de materiais biocompatíveis e biodegradáveis, associados a biomoléculas indutoras, e células (4). Mesmo podendo ser de extrema utilidade, o uso da bioimpressão ainda não é totalmente viável, necessitando de mais estudos para seleção de uma tríade ideal de biomaterial, células e fatores indutores, que favoreçam a diferenciação celular, apresentem propriedades mecânicas compatíveis com o tecido alvo e mantenha alta proliferação celular.

Com este propósito, a seleção do material ideal para a produção do arcabouço celular é extremamente importante, visto estar diretamente associada as propriedades mecânicas, reológicas, capacidade de impressão (*printabilidade*), e proliferação celular (5). As matrizes de suporte celular podem ser construídas com materiais naturais, como colágeno e gelatina ou com materiais sintéticos, como poliésteres bioabsorvíveis. Também podem ser

utilizados materiais poliméricos, materiais inorgânicos ou compósitos, que associam ambas as categorias buscando o melhor desempenho de cada um (5). Um dos biomateriais bastante estudado para aplicações na engenharia tecidual é o hidrogel de gelatina Metacrilato (GelMA), devido suas características biológicas e físicas, como: permitir a adesão e proliferação celular, fácil aderência ao sítio em que será aplicado, biocompatibilidade e capacidade de mimetizar as matrizes extracelulares (5, 6). O GelMA, associado com fotoiniciadores, pode ser utilizado com diferentes tipos de linhagens celulares e permite a agregação de diferentes moléculas bioativas na dependência do tecido alvo (5).

Os hidrogeis de GelMA exibem propriedades reológicas interessantes, como a pseudoplasticidade e tixotropia (7), que favorecem a sua bioimpressão, tornando-os adequados para várias aplicações biomédicas, como a regeneração tecidual óssea (5). Entretanto as propriedades reológicas dos hidrogeis a base de GelMA variam de acordo com diversos fatores como, grau de metacrilatação, concentração do GelMA, tipo e concentração de fotoiniciador, grau de reticulação da rede (5). Altas propriedades mecânicas são obtidas com géis mais viscosos e são desejáveis na engenharia dos tecidos ósseos para suportar as cargas mecânicas incidentes no local (5). Entretanto, o aumento da viscosidade do gel, tende a aumentar as tensões cisalhantes sobre as células ao passarem pela agulha durante a bioimpressão por extrusão, podendo comprometer a proliferação celular (5, 8).

2 REVISAO LITERATURA

2.1 GelMA

A gelatina metacrilato (GelMA) foi mencionado pela primeira vez em 2000 por Van Den Bulcke et al., é produzida através da reação de gelatina com anidrido metacrílico (9), na qual grupos de metacrilato são inseridos nos grupos laterais da gelatina, contendo amina. A solução de GelMA pode formar hidrogéis que são irreversivelmente reticulados através de ligações covalentes quando submetidos a radiação ultravioleta (UV), na presença de um fotoiniciador (10).

Em linhas gerais, o GelMA caracteriza-se por ser um material fotorreticulável, de baixo custo e seguro para engenharia de tecidos, capaz de promover a proliferação, migração e disseminação celular em ambientes 3D (10). O GelMA tornou-se um biomaterial atraente nos últimos anos para a engenharia de vários tecidos, como ósseo e vascular, uma vez que fornece às células sinais biológicos e mecânicos, como adesão e proliferação celular, e sua funcionalização permite adaptar propriedades físico-químicas específicas (10). Portanto, pesquisas futuras com GelMA devem se concentrar na convergência de tecnologias de biofabricação e engenharia de tecidos para criar equivalentes de tecidos de volumes grandes, bem definidos e funcionais após a maturação (10).

2.2 Propriedades físico-químicas

As propriedades físico-química dos hidrogéis GelMA são afetadas por uma variedade de fatores, incluindo a concentração de GelMA, concentração do fotoiniciador, métodos de fotopolimerização, tempos de fotopolimerização, dose ultravioleta (UV) durante a fotoiniciação, eficiência da substituição do metacrilato, condições de reticulação e características geométricas (6, 9, 11).

A quantidade de anidrido utilizado tem influência tanto na taxa de intumescimento, como na rigidez do GelMA. Em geral, uma alta relação

anidrido/gelatina pode levar a uma menor taxa de intumescimento e uma maior rigidez do material (12). O grau de substituição (metacrilização) em torno de 12% resultou em uma taxa de intumescimentos de 19% de sua massa, enquanto um grau de substituição em torno de 71% resultou em uma taxa de intumescimento de 6,8% (12).

Em estudo que avaliou o efeito do grau de metacrilização e da concentração do GelMA na resistência mecânica (kPa), observou-se que o hidrogel com 85% de grau de metacrilização em uma porcentagem de 10% GelMA apresentou uma resistência mecânica de 9,8 kPa enquanto o hidrogel de 100% de grau de metacrilato apresentou 14,2 kPa na mesma concentração. Enquanto o mesmo hidrogel, com a concentração de 15% de gelatina apresentou uma resistência mecânica de 31,2 e 56,0 kPa com grau de metacrilização de 85% e 100% respectivamente (11).

As curvas de tensão-deformação em ensaio de compressão mostraram uma correlação positiva entre as concentrações de GelMA e o módulo de elasticidade por compressão, devido a um aumento da densidade de reticulação em concentrações mais altas de GelMA, variando de menos de 5 kPa (5% GelMA) a 110 kPa (20% GelMA) (13) e de 5kPa (5% GelMA) a 180 kPa (20% GelMA) (14).

Já o tamanho dos poros dos hidrogéis GelMA são inversamente proporcionais à concentração de GelMA usada durante a síntese. Concentrações de GelMA de 5 e 25 (p/v)% produziram média de diâmetros de poros de 34 e 4 μm , respectivamente (15).

As propriedades físicas dos hidrogéis desenvolvidos podem ser facilmente modificadas variando a concentração do hidrogel. A tabela 1 apresenta um resumo das propriedades físicas do GelMA com diferentes concentrações.

Tabela 1: Propriedades físicas do GelMA em diferentes concentrações

Concentração de GelMA	Módulo compressivo	Módulo de tração	Resistência à tração	Alongamento na ruptura	Proporção de intumescimento	Degradação [%]*		
						3 dias	7 dias	56 dias
[%]*	[kPa]*	[kPa]*	[kPa]*	[%]*	[%]*			
5	3 ± 1	9 ± 1	4 ± 1	40 ± 6	1476 ± 28	100	100	100
7,5	14 ± 2	17 ± 2	7 ± 1	39 ± 5	1273 ± 26	80 ± 5	100	100
10	26 ± 3	57 ± 9	18 ± 1	34 ± 5	719 ± 24	30 ± 2	65 ± 3	100
15	89 ± 9	153 ± 18	24 ± 2	27 ± 5	567 ± 19	20 ± 3	35 ± 4	100
20	108 ± 8	194 ± 16	29 ± 3	22 ± 4	470 ± 9	8 ± 1	24 ± 4	80 ± 7

*Fonte: Zhao et al. 2015

Variando a concentração da solução de pré-polímero GelMA, as propriedades físicas e biológicas dos hidrogéis resultantes podem ser adequadamente controladas para atender requisitos desejados. Hidrogéis de concentrações mais altas apresentaram melhor rigidez do material, para adesão celular e suportar cargas mecânicas. Concentrações mais baixas de GelMA apresentaram maior alongamento na ruptura, portanto, em casos em que a capacidade de deformação antes da ruptura é desejada eles seriam mais indicados, lembrando de considerar outras características desejadas também. A taxa de degradação indica a capacidade do material de se decompor ao longo do tempo e pode ser um fator importante a ser considerado ao selecionar um hidrogel de GelMA, já que há uma relação entre concentração de GelMA e taxa de degradação.

O aumento da concentração de GelMA também resulta em um aumento na viscosidade, por aumentar a densidade de ligações cruzadas no material (17). Já o aumento do grau de metacilação resulta em redução da viscosidade pela diminuição do tamanho médio dos segmentos das cadeias poliméricas (16).

A exposição total aos raios UV é um parâmetro sensível para controlar a rigidez e o intumescimento dos hidrogéis GelMA (14, 17). Os módulos compressivos dos hidrogéis 20% GelMA reticulados por 30 min foram mais de dez vezes maiores do que os reticulados por 5 min, enquanto os hidrogéis reticulados por 10 min foram mais de seis vezes maiores do que os reticulados por 5 min. (14). A taxa efetiva de intumescimento também é altamente dependente da exposição aos raios UV, diminuindo de 60% com 5 minutos de exposição para intumescimento insignificante após 25 ou mais minutos de exposição aos raios UV (14).

A taxa efetiva de intumescimento também é altamente dependente da exposição aos raios UV, diminuindo de 60% com 5 minutos de exposição para intumescimento insignificante após 25 ou mais minutos de exposição aos raios UV (14).

2.3 Reologia

A viscoelasticidade do hidrogel GelMA pode ser caracterizada pela medição da oscilação de cisalhamento em pequenas deformações. As medições de reologia baseadas em modos de deformação de cisalhamento oscilatório são realizadas com um reômetro equipado com placas ásperas paralelas (9).

As propriedades físicas, como a viscosidade, dos hidrogéis de gelatina modificada com metacrilamida são fortemente afetadas pela concentração total de polímero, quanto maior a concentração de polímero, maior o módulo elástico e viscoso dos hidrogéis (18).

A metacrilização mais ampla (100%) do GelMA em concentrações de 10%, 15% e 20% em peso resultou em uma viscosidade menor (média de 8,5 mPa.s) a uma temperatura de 37 °C. Por outro lado, uma metacrilização mais limitada (85%) do GelMA resultou em uma viscosidade maior (média de 90,2 mPas.s) na mesma temperatura (11).

O hidrogel de GelMA exibe pseudoplasticidade. A pseudoplasticidade é uma propriedade reológica na qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento aplicada ao material. Isso significa que o hidrogel de GelMA se torna menos viscoso e mais fluido quando submetido a forças de cisalhamento, como agitação ou impressão 3D (19).

2.4 Estudos *in vitro*

Os três elementos-chave da engenharia de tecidos são células, fatores de crescimento e scaffolds. Portanto, envolve o crescimento de células em um ambiente tridimensional (3D) apropriado, conhecido como scaffold, guiado por fatores de crescimento apropriado (10). A principal função de um scaffold é replicar a estrutura da matriz extracelular natural que auxilia a proliferação, diferenciação e biossíntese de células. Além disso, um scaffold é colocado no local de um defeito para auxiliar a regeneração e impedir que células invasoras indesejáveis ocupem o espaço do defeito (10).

Os hidrogéis à base de GelMA, tem sido amplamente utilizado como scaffold para engenharia tecidual pois promovem a adesão e o crescimento celular, além de facilitarem a remodelação celular (6), mimetizando a matriz extracelular. Além disso, a modificação das condições durante a síntese do GelMA permite o ajuste preciso das propriedades do hidrogel para acomodar o tecido alvo e garantir a sobrevivência celular, ou seja, ao modificar as condições durante a síntese do GelMA, é possível alterar as características do hidrogel para torná-lo mais adequado para suportar e manter as células de um tecido específico (6).

Em estudo para avaliar a viabilidade e a capacidade de crescimento de células-tronco mesenquimais (hMSCs) em diferentes concentrações de GelMA foi realizado um ensaio em que as hMSCs foram inseridas ao hidrogel de de GelMA e bioimpressas, e após a bioimpressão, as estruturas de hidrogel foram cultivadas por 7 dias em condições estáticas. No dia 1, as viabilidades das hMSCs monocultivadas foram relativamente baixas, em torno de 50%, provavelmente devido ao estresse externo causado pelo processo de bioimpressão. No entanto, após 7 dias de cultura, as viabilidades das hMSCs aumentaram para 77%, indicando que as células permaneceram proliferativas nas fibras de hidrogel bioimpressas. Os resultados mostraram que a quantidade de dsDNA nas fibras bioimpressas foi significativamente maior do que nas hMSCs monocultivadas, indicando um aumento na proliferação celular ao longo do tempo. Esses resultados sugerem que as hMSCs encapsuladas em GelMA apresentaram viabilidade e capacidade de proliferação, o que é essencial para o desenvolvimento de construções de tecido ósseo bioimpressas (20).

Um estudo *in vitro*, mostrou boa biocompatibilidade do GelMA, podendo chegar a 96%, para o GelMA baseado em dois tipos de gelatina. A gelatina tipo B (livre de endotoxinas) e tipo A (com altos níveis de endotoxinas), sendo que o último apresentou reações inflamatórias, possivelmente causadas por altos níveis de endotoxinas. A ausência de atividade pró-inflamatória forneceu uma primeira prova de compatibilidade imunológica para o GelMA baseado em tipo B. A presença das endotoxinas pode obscurecer as observações influenciando o comportamento celular (por exemplo, estimulação da osteogênese) ou podem

provocar outros efeitos indesejados, este aspecto é geralmente subestimado no campo (21).

Uma análise quantitativa da viabilidade celular foi realizada utilizando o kit Live/Dead Assay e o CCK-8. Os resultados mostraram que três grupos de hidrogéis apresentaram boa viabilidade celular, com valores acima de 85% no dia 1 e 90% no dia 7. Sendo os três grupos: um hidrogel de GelMA puro a 10%, grupo GelMA/ECM que consiste em combinação do hidrogel GelMA com partículas de matriz extracelular (ECM), derivadas de tecido cartilaginoso natural, e grupo GelMA/ECM-PFS, que é uma versão modificada do grupo GelMA/ECM, onde as partículas de ECM são modificadas com o peptídeo PFS. Todos os scaffolds, produzidos a partir da reticulação dos géis em um molde cilíndrico, propiciaram o crescimento celular (22).

Têm-se observado, que o hidrogel GelMA fornece um microambiente que promove a diferenciação osteogênica de células-tronco, sendo capaz de desencadear a deposição mineral em osteoblastos humanos normais primários na ausência de quaisquer fatores osteogênicos exógenos (10). Scaffolds preparados com 5% de GelMA exibiram uma maior deposição de cálcio em comparação com os preparados com 10% de GelMA, sugerindo que a concentração desse componente pode influenciar a capacidade dos hidrogéis em promover a diferenciação celular. Além disso, scaffolds contendo 5% de GelMA, ao serem semeados com células-tronco mesenquimais, demonstraram uma maior capacidade de promover a calcificação da matriz extracelular em comparação com aqueles contendo 10% de GelMA. Esse efeito pode ser atribuído à maior porosidade e tamanho dos poros observados no hidrogel formado com menor concentração de GelMA em condições *in vitro* (8,23). Na avaliação de hidrogéis de GelMA irradiados em moldes cilíndricos, células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) foram isoladas e cultivadas e demonstraram capacidade de diferenciação multidirecional (14). Após 14 dias de cultura em meio de indução osteogênica, a coloração com vermelho de alizarina mostrou grande quantidade de calcificação da matriz com formação de nódulos de cálcio, indicando que as BMSCs eram capazes de diferenciação osteogênica (22). Com o objetivo de avaliar o efeito da diferenciação osteogênica influenciada pela concentração de polímeros, células-tronco

mesenquimais (MSCs) isoladas da medula óssea de ratos foram semeadas em scaffolds de GelMA, os quais foram cultivados em meio osteogênico. Utilizando hidrogéis de alginato-GelMA com diferentes composições e concentrações para analisaram-se a viabilidade celular, diferenciação osteogênica e a expressão gênica por meio de ensaios de coloração histoquímica, PCR em tempo real e imunofluorescência. Resultados mostraram que a adição de GelMA ao hidrogel de alginato reduziu a elasticidade da matriz, afetando a viabilidade e a diferenciação osteogênica das MSCs encapsuladas. A presença de GelMA aumentou a viabilidade celular, mas diminuiu a diferenciação osteogênica. Além disso, a presença de sinais indutores foi confirmada como sendo importante para a diferenciação osteogênica das MSCs. O estudo demonstrou a importância da elasticidade da matriz e dos sinais indutores no controle do destino e função das células encapsuladas nos hidrogéis (24).

2.5 Fotoiniciador

O fotoiniciador fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de lítio (LAP) se tornou uma opção promissora como fotoiniciador para aplicações de encapsulamento celular em hidrogéis, já que mostrou alta solubilidade em água, LAP é mais solúvel em água do que outros fotoiniciadores, como o I2959, o que facilita a sua utilização em sistemas aquosos, mostrou também eficiência de polimerização, demonstrou ter taxas de polimerização mais rápidas quando exposto a uma fonte de luz com comprimento de onda de 365 nm, tornando-o eficiente na formação de hidrogéis, e também sua proliferação celular, os hidrogéis iniciados com LAP mostraram alta proliferação celular, com sobrevivência de 95% ou mais para células encapsuladas em fibroblastos (25).

Tanto a luz ultravioleta quanto a luz visível podem iniciar a fotoreticulação utilizando fotoiniciadores, como o Irgacure 2959 e Eosin Y, onde o Irgacure pode ser mais indicado devido à sua menor toxicidade e à capacidade de iniciar a reticulação do hidrogel de GelMA usando luz visível (9), eliminando assim os potenciais efeitos colaterais de longo prazo nas células gerado pela luz UV. Embora a atividade celular não seja afetada na exposição de curto prazo, o uso de luz ultravioleta pode ter efeitos colaterais potenciais

de longo prazo nas células (9). Portanto concentrações mais baixas de fotoiniciadores são adequadas para minimizar a toxicidade e obter taxas de polimerização razoáveis no Gelma (25).

2.6 Estudos *in vivo*

Diversas aplicações de GelMA na área médico odontológica tem sido relatadas em estudos *in vivo* (26, 27, 28).

Em um estudo, hidrogéis GelMA foram desenvolvidos para avaliar seus efeitos na angiogênese na membrana corioalantóica de embrião de galinha (CEA). Amostras estéreis de hidrogel GelMA, foram depositadas na membrana. No grupo em que houve a aplicação de GelMA, a espessura, quantidade de pontos de ramificação e comprimento de vasos sanguíneos formados foram superiores ao grupo controle, porém não apresentaram significância estatística (26).

Estudo envolvendo a implantação de scaffolds de GelMA subcutânea no dorso de ratos mostrou uma resposta inflamatória moderada, com a presença de macrófagos e células granulares na cápsula de tecido conjuntivo circundante. No estudo, os condrócitos foram isolados da cartilagem costal de ratos recém-nascidos e misturados com os hidrogéis de colágeno tipo I e GelMA. A formação de cartilagem foi observada nos grupos de animais que receberam ambas as scaffolds, indicando que as células presentes nos hidrogéis contribuíram para a formação do tecido cartilaginoso. A análise histológica e imuno-histoquímica revelou a presença de colágeno tipo I e II nas células do novo tecido formado (27). Outro estudo também mostra que o uso de hidrogel Gelma associado a diferentes concentrações de PRP (Plasma Rico em Plaquetas) em bioimpressão mostra efeitos positivos na proliferação, migração e diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) e promove a polarização de macrófagos para o fenótipo anti-inflamatório M2. Além disso, em um modelo de coelho, o hidrogel PRP-GelMA mostrou melhor regeneração da cartilagem e do osso subcondral em comparação com o hidrogel GelMA puro (29).

Estudo utilizando células pré-diferenciadas 3T3-L1 (preadipócitos) e HUVECs (células endoteliais vasculares) para induzir a formação de adipócitos (células de gordura) nos scaffolds compostos de GelMA/CS (CaSiO₃) impressos em 3D. Os resultados mostraram que os scaffolds promoveram a proliferação, migração, e angiogênese das células endoteliais vasculares *in vitro*. Além disso, em um modelo de implantação subcutânea em camundongos, os scaffolds de GelMA puro estimularam a formação de tecido adiposo e vasos sanguíneos após três semanas. Esses resultados indicam que os scaffolds de GelMA/CS e GelMA puro têm um efeito benéfico na angiogênese e na regeneração de tecido adiposo vascularizado (28).

Um estudo *in vivo*, scaffolds de GelMA bioimpressas foram implantados em defeitos ósseos críticos na calota craniana de ratos, e observou-se que os tecidos vascularizados construídos apresentaram excelente desempenho na neoformação óssea. Além disso, a biossegurança dos scaffolds também foi avaliada e não foram observados efeitos adversos em órgãos como coração, fígado, baço, pulmão e rim (30). Estudo onde hidrogéis de GelMA a 5% carregados de osteoblastos para a fabricação de scaffolds implantadas entre tendão e osso de ratos demonstrou sinais de diferenciação osteogênica, mostrando a expressão aumentada do marcador Runx2, que é um fator de transcrição relacionado à formação óssea. Isso indica que o GelMA e a abordagem de estratificação celular utilizada no estudo foram capazes de promover a diferenciação osteogênica na interface entre tendão e osso (31).

O uso do Gelma também foi avaliado na regeneração pulpar, em estudo que analisou segmentos de raiz dentária preenchidos com GelMA acelular, GELMA encapsulado com células-tronco da polpa dental humana (hDPSCs) e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) em contraste com controle sem material. Os segmentos de raízes foram implantados no dorso de ratos nus por 4 a 8 semanas e mostraram que nos implantes preenchidos com GelMA encapsulado com hDPSCs e HUVECs, houve um aumento na celularidade, formação de tecido pulpar robusto e formação de neovasos organizados. Nos implantes preenchidos com GelMA acelular, também houve infiltração celular e formação de neovasos, mas em menor grau. Já nos

implantes sem material, houve infiltração celular, mas com menor organização do tecido pulpar (32).

O estudo realizou testes de proliferação celular utilizando células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AD-MSCs) encapsuladas em hidrogéis de GelMA suplementados com plasma rico em plaquetas (PRP). Foram realizados testes de viabilidade celular utilizando a coloração de calceína-AM e o ensaio CellTiter-Blue (CTB) em diferentes concentrações de PRP e GelMA. Os resultados mostraram que a adição de PRP aumentou a viabilidade e a proliferação celular, especialmente em hidrogéis com maior concentração de PRP. Além disso, a adição de PRP também promoveu a diferenciação osteogênica das AD-MSCs. Esses resultados sugerem que os hidrogéis de GelMA suplementados com PRP podem ser uma ferramenta valiosa para cultura tridimensional de células e aplicações de engenharia de tecidos (33).

Em um estudo *in vivo* para avaliar a eficácia dos condutos de hidrogel de GelMA na reparação de lesões na medula espinhal. Foram utilizados ratos com lesão completa da medula espinhal. Após o tratamento, as células-tronco neurais (NSCs) foram implantadas e cultivadas em meio de proliferação por 1 dia e, em seguida, transferidas para o hidrogel, que foi implantado nos locais lesionados da medula espinhal dos ratos. Observou-se que o grupo com uso de GelMA apresentaram uma maior presença de neurônios em relação ao grupo controle (sem nenhum material) (34).

3 OBJETIVO

Dado o exposto, os objetivos deste estudo foram: (1) sintetizar hidrogéis e matrizes bioimpressas de GelMA em diferentes concentrações; (2) avaliar as propriedades reológicas (viscosidade, tixotropia e fotoreologia) dos hidrogéis de GelMA; e (3) avaliar as propriedades biológicas de adesão e proliferação de células derivadas do ligamento periodontal humano semeadas sobre os hidrogéis de GelMA ou bioimpressas com eles. A hipótese nula do estudo é que os hidrogéis não apresentem diferenças quanto as propriedades reológicas e ao crescimento celular em função das concentrações de GelMA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese da Gelatina-Metacrilato

Na síntese da Gelatina-Metacrilato (GelMA), macrômeros de gelatina contendo grupos primários de amina foram reagidos com anidrido metacrílico para adicionar grupos pendentes de metacrilato.

De forma resumida, 10% gelatina de pele suína tipo A foi misturada a solução tampão fosfato salino de Dulbecco (DBPS), à 60 °C, até completa dissolução. Sob agitação, 2,5% anidrido metacrílico foi adicionada à solução de gelatina, à 50 °C em taxa de 0,5 mL/min e mantido por 1 hora. A solução foi diluída 5x em DBPS a 40 °C para parar a reação, a mistura foi dialisada contra água destilada utilizando tubo de diálise de 12-14 kDa (Sigma Aldrich) por 1 semana a 40°C para remover sais e ácido metacrílico. A solução foi liofilizada e armazenada a temperatura ambiente até o uso posterior (16).

Para confirmar a metacrilção da gelatina, após a liofilização o produto da síntese foi submetido a análise de ressonância magnética de prótons ¹H RMN em espectrômetro Gemini de 200MHz). Na técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), pulsações de radiofrequência são aplicadas a uma amostra imersa em um campo magnético de alta intensidade. A absorção de energia pelos núcleos atômicos é seletiva, dependendo das propriedades magnéticas de cada núcleo. Os sinais de RMN captados refletem o ambiente eletrônico do núcleo e os movimentos das moléculas. A intensidade dos prótons em todos os espectros ¹H RMN foi normalizado contra o sinal de normalização de referência centrado em 7,31 ppm (3H), que corresponde aos prótons aromáticos dos aminoácidos fenilalanina que são quimicamente passivos na reação de metacrilção da gelatina e permanecem intactos.

O grau de metacrilção foi quantificada pela equação abaixo, pois a intensidade da proporção dos sinais integrados dos prótons de metileno lisina e hidrolisina centrados em 3 ppm foram desaparecendo nos GelMAs em relação à gelatina pura.

$$\% \text{Metacrilada} = \left[1 - \left(\frac{\text{ÁREA DO PICO DO METILENO DA LISINA DA GEL-MA}}{\text{ÁREA DO PICO DA ÁREA DA LISINA METILENO DA GELATINA}} \right) \right] * 100$$

Outra maneira de se calcular a integração foi integrar a área do pico centrado em 7,31 referente aos prótons aromáticos da fenilalanina, e integrar o pico em 5,4 referente a um dos prótons vinílicos do GEL-MA. Desta forma teria-se a seguinte correlação:

$$\% \text{Metacrilada} = \left[1 - \left(\frac{\text{ÁREA DO PICO PROTON VINILICO GEL-MA}}{\text{ÁREA DO PICO REFERENCIA PRÓTONS AROMÁTICOS}} \right) \right] * 100$$

4.2 Síntese do Hidrogel

Para criar uma rede de hidrogel, a gelatina-metacrilato é reticulada usando irradiação UV na presença de um fotoiniciador. O macrômero GelMA liofilizado sintetizado foi misturado nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% em DPBS com 0,5% (p/v) lítio fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato (L-TPO), como um fotoiniciador, a 40°C, até a completa dissolução.

4.3 Análises Reológicas

Neste estudo, a caracterização reológica dos materiais foi realizada utilizando um reômetro PHYSICA MCR300 (Paar Physica), equipado com uma geometria de cone e placa, com ponta CP25-1/Ti, que apresenta 24,95mm de diâmetro e concentricidade de 19µm (Figura 1A).

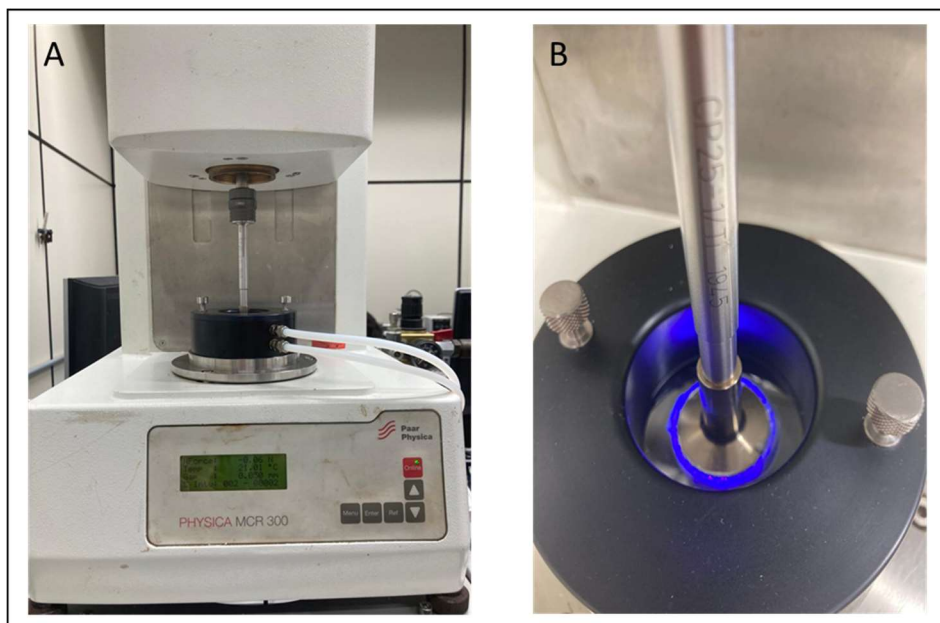


Figura 1: (A) reômetro do tipo cone/placa utilizado nas análises reológicas; (B) Análise de fotoreologia, mostrando o cone em contato com a placa e o hidrogel sendo irradiado por baixo da placa.

Hidrogéis nas concentrações de 5, 10, 15 e 20% foram analisados ($n=3$) quanto a viscosidade em função da taxa de cisalhamento, pseudoplasticidade, tixotropia e fotoreologia. As amostras foram descongeladas em um mixer de eppendorf a 45°C e agitadas em um vórtex para remover bolhas. Os testes foram conduzidos a uma temperatura constante de 37°C , com uma faixa de velocidade de cisalhamento variável e zero gap entre o cone e a placa. A análise dos dados reológicos foi realizada utilizando o software US200 V2-50 do reômetro, que permitiu a determinação dos parâmetros de viscosidade.

A viscosidade foi mensurada em função da taxa de cisalhamento. Foram realizadas 15 medidas, obtidas em uma rampa logarítmica da taxa de cisalhamento, indo de 1×10^4 a 1×10^{-4} $1/\text{s}$. As medidas foram obtidas em intervalos de 25s, totalizando 375s de experimento. Os gráficos de viscosidade em função da taxa de cisalhamento se aproximam de um modelo de lei de potência, assim para cada hidrogel, as curvas das triplicatas foram ajustadas uma curva de potência que permite obter os valores do índice de consistência K e do índice de comportamento de fluido (n), segundo a fórmula: $\eta = K_1 \dot{\gamma}^{(n-1)}$. Onde: η = viscosidade; K_1 = índice de consistência (Pa.s), que indica o grau de

resistência do fluido diante do escoamento; $\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento e n = índice de comportamento de fluxo (adimensional). O índice K indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento e de acordo com o índice de comportamento, podemos classificar o comportamento do fluido em: fluido pseudoplástico ($n < 1$) ; fluido dilatante ($n > 1$) e fluido newtoniano ($n = 1$).

A tixotropia é uma propriedade de alguns fluidos que indica aumento da viscosidade no estado de repouso e uma diminuição da viscosidade em função do tempo quando submetido a uma tensão de agitação constante. Para avaliar se os materiais são tixotrópicos, bem como calcular sua intensidade, a tensão de cisalhamento dos hidrogéis foi mensurada quando submetida a um carregamento crescente seguido de um carregamento decrescente da taxa de cisalhamento. Inicialmente a uma taxa de cisalhamento foi mantida constante em 0,01 1/s e foram feitas 6 medidas da tensão de cisalhamento, coletadas em intervalo de 10 s, totalizando 60s, a seguir, iniciou-se um carregamento onde variando-se a taxa de cisalhamento em uma rampa logarítmica de 0,01 a 1×10^3 1/s, foram coletadas 15 medidas, com 25 s de intervalo entre elas, totalizando 375 s para finalizar o carregamento. Ao chegar na taxa de cisalhamento máxima, esta foi mantida constante, e realizou-se 6 medidas da tensão cisalhante, com intervalo de 10s entre elas, totalizando 60s, prosseguiu-se com o redução logarítmica da taxa de cisalhamento de 1×10^3 a 0,01 1/s, foram coletadas 15 medidas de tensão de cisalhamento, com 25s de intervalo entre elas, totalizando 375s de taxa decrescente de cisalhamento. Os gráficos de tensão de cisalhamento (Pa) em função da taxa de cisalhamento foram plotados no programa OriginPro, a análise da tixotropia dos géis, foi dada pela histerese, calculada a partir da integração da área entre as curvas de tensões geradas nos carregamentos crescente e decrescente por diferentes taxas de cisalhamento.

A análise da fotoreologia permite identificar a alteração da viscosidade quando o hidrogel é irradiado com uma luz ultravioleta e reticula. Para este estudo, uma lâmpada UV de 380nm e $134,61 \text{mW/cm}^2$ (Biolambda, São Paulo, Brasil) foi acoplada ao reômetro, abaixo da placa de vidro transparente usada para os ensaios, permitindo a irradiação do hidrogel através da placa de vidro. O hidrogel foi submetido a uma taxa de cisalhamento constante de 1 1/s por

600s. Após 90s, a lâmpada UV foi ligada e a irradiação foi mantida até o final do experimento.

Dados foram coletados a cada 1s e o tempo de reticulação foi calculado como a diferença entre o momento que a lâmpada for acesa e a viscosidade começa a subir abruptamente até o momento em que se inicia uma curva que tende a formação de um novo platô da viscosidade. Uma vez que o gel está reticulado, o cisalhamento com o tempo acaba por romper o hidrogel, interrompendo o experimento.

4.4 Isolamento de Células Derivadas do Ligamento Periodontal Humano (PDLC)

Culturas primárias de células derivadas de ligamento periodontal humano foram obtidas a partir de fragmentos de ligamento periodontal de dentes permanentes humanos, através da técnica de explante (16), após submissão e aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 68449423.9.0000.0081) e com o consentimento livre e esclarecido dos pacientes. Dentes permanentes humanos hígidos com indicação para exodontia, por questões ortodônticas ou protéticas, foram extraídos com anestesia local, e imediatamente transportados ao laboratório em meio de cultivo celular DMEM, suplementado com 10% soro fetal bovino e 2% de antibiótico e antimicótico. O ligamento periodontal foi removido por raspagem com bisturi, o tecido foi lavado 2 vezes em solução estéril de PBS (solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio, pH 7,2), suplementado com 4% de antibiótico penicilina/estreptomicina e foram dissecados em vários fragmentos. Após remoção do PBS, os fragmentos permaneceram em solução de tripsina em estufa a 37 °C, durante 5 minutos. Após inativação da tripsina com meio contendo soro fetal bovino (SFB), os explantes foram colocados em frascos de cultivo contendo meio DMEM/Ham's F12 suplementado com 15% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e mantidos em cultura para isolamento das células derivadas do ligamento periodontal humano. As células provenientes dos fragmentos foram tripsinizadas e plaqueadas em novas placas de cultivo. As culturas foram mantidas em semi-confluência até

sua utilização ou seu congelamento, para evitar diferenciação. Para o congelamento, as células foram suspensas em meio de cultura contendo 20% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido, mantidas em - 80°C por 24h para posterior armazenagem em nitrogênio líquido.

4.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular (AlamarBlue)

Para confecção do hidrogel utilizado nos ensaios celulares, o GelMA liofilizado foi previamente submetido a 10 minutos de exposição a luz UV para esterilização, e posteriormente misturado a PBS estéril e fotoiniciador para confeccionar os hidrogéis. Para avaliar a proliferação celular em scaffolds de GelMA, foi utilizado o ensaio AlamarBlue. Células derivadas do ligamento periodontal humano, na passagem 5, foram destacadas, contadas e ressuspensas em meio de cultura celular. Foram adicionados 0.5 mL/poço de hidrogéis de GelMA nas concentrações de 10, 25 e 20% em uma placa de 48 poços, totalizando três repetições por grupo experimental e fotoativados por 120s com lâmpada UV em 405 nm. As células foram semeadas sobre os hidrogéis na concentração de 1×10^5 células/poço. Após 24 e 72h da semeadura, foi realizado o ensaio de AlamarBlue, onde 0,3 mL de uma solução de 10% AlamarBlue em meio de cultura clonogênico, foi adicionada às amostras e incubado por 3 h a 37°C, em atmosfera com 5% CO₂. Após esse período, duas alíquotagens de 100 µL de amostras foram removidas e transferidas para uma placa de cultura de 96 poços para medir a absorbância em 560 nm usando um leitor de microplacas. Todo o processo foi realizado em um fluxo laminar com recipientes e instrumentais devidamente esterilizados. Foi realizado um grupo controle do ensaio no qual não havia presença de hidrogel nem células. A redução do AlamarBlue foi calculada em percentual relativo à absorbância do grupo controle.

4.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular (CCK-8)

A confecção dos hidrogéis de GelMA deu-se da mesma forma que no ensaio de Alamar Blue, descrito previamente. Para avaliar a viabilidade celular em scaffolds bioimpressos de GelMA, foi utilizado o ensaio Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil). Células derivadas do ligamento periodontal humano, na passagem 5, foram destacadas, contadas e ressuspensas em meio de cultura celular e homogenizadas em hidrogéis de GelMA a 37°C, de forma a criar bioatintas com densidade celular de 7×10^5 células/mL e concentrações de GelMA de 10%, 15% ou 20%. As bioatintas foram mantidas e impressas a temperatura ambiente de 20°C. Foram bioimpressos matrizes de suporte celular das três bioatintas (n=5), usando um bioimpressora por extrusão e agulha 20G (Genesis II, 3D BioSystem, Campinas, Brasil). As matrizes de suporte celular foram bioimpressas em formato cilíndrico, com 10 mm diâmetro e 1,5 mm altura, com padrão de preenchimento retilíneo linear com densidade de 20%. Os bioimpressos foram fotoativados por 30s com lâmpada UV de 405 nm, imediatamente após a impressão. Os parâmetros utilizados para impressão foram: velocidade de impressão 7mm/s, altura do filamento de 0.5mm, multiplicador de extrusão de 2.88 para concentrações de GelMA de 10 e 15% e 5.4 para concentração de 20%. Após 24h da semeadura, foi realizado o ensaio de CCK-8, onde 0,3 mL de uma solução de 10% CCK-8 em meio de cultura clonogênico, foi adicionada às amostras e incubado por 3 h a 37°C, em atmosfera com 5% CO₂. Após esse período, duas alíquotagens de 100 µL de amostras foram removidas e transferidas para uma placa de cultura de 96 poços para medir a absorbância em 450 nm usando um leitor de microplacas. Todo o processo foi realizado em um fluxo laminar com recipientes e instrumentais devidamente esterilizados.

4.6 **Análise Estatística**

Dados foram checados quanto a normalidade (teste de Shapiro Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene) e submetidos Análise de Variância (ANOVA) de fator único e Teste de Tukey. Análise de correlação de Pearson foi realizada para correlacionar a tixotropia com a concentração de GELMA nos hidrogéis. Em todos os ensaios foi considerado um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Síntese e caracterização do GeIMA

De acordo com ^1H RMN sugere-se que a gelatina foi metacrilada devido a uma ligação que ocorre entre o grupo amina (NH_2) da gelatina e o anidrido metacrílico (AM). O acoplamento de AM com grupo amina resulta na formação de ligação metacrilamida. A conjugação de grupos AM foi confirmada e quantificada *via* espectroscopia de ^1H RMN (Figura 2).

O aparecimento de picos de ressonância característicos dos dois prótons metileno do grupo metacrilato vinil ($\text{H}_2\text{C}=\text{C}-$) em torno de 5,40 e 5,6 ppm (2H) e prótons metil do grupo metacrilato vinil ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3$) em 1,91 ppm (3H) confirmou a metacrilagem. Todos estes picos confirmaram que o AM foi enxertado com sucesso nas cadeias de gelatina. Além disso, uma vez que apenas os aminoácidos Lisina e Hidroxilisina possuem as aminas primárias como sítios reativos que podem se ligar ao AM através de uma reação de adição nucleofílica, uma diminuição gradual dos prótons metileno do sinal Lisina (LIS) e Hidroxilisina (HLIS) ($\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}$) em torno de 3 ppm (2H) pode ser considerado para comprovar a síntese do GeIMA.

O grau de metacrilagem foi calculado em 82.2% e 82%, utilizando-se para o cálculo respectivamente, a área do pico de metileno da lisina e a área do pico de próton vinílico.

O material não apresentou picos característicos de anidrido residual em 6,05 e 5,71, o que indica que a dialise foi eficiente no processo de purificação. Nos espectros abaixo há alguns outros picos característicos da gelatina em 2,69; 3,0; 3,18; 3,61 ppm que está correlacionado com resíduos de metileno ($-\text{CH}_2-$) dos aminoácidos, como ácido aspártico, lisina, arginina, respectivamente.

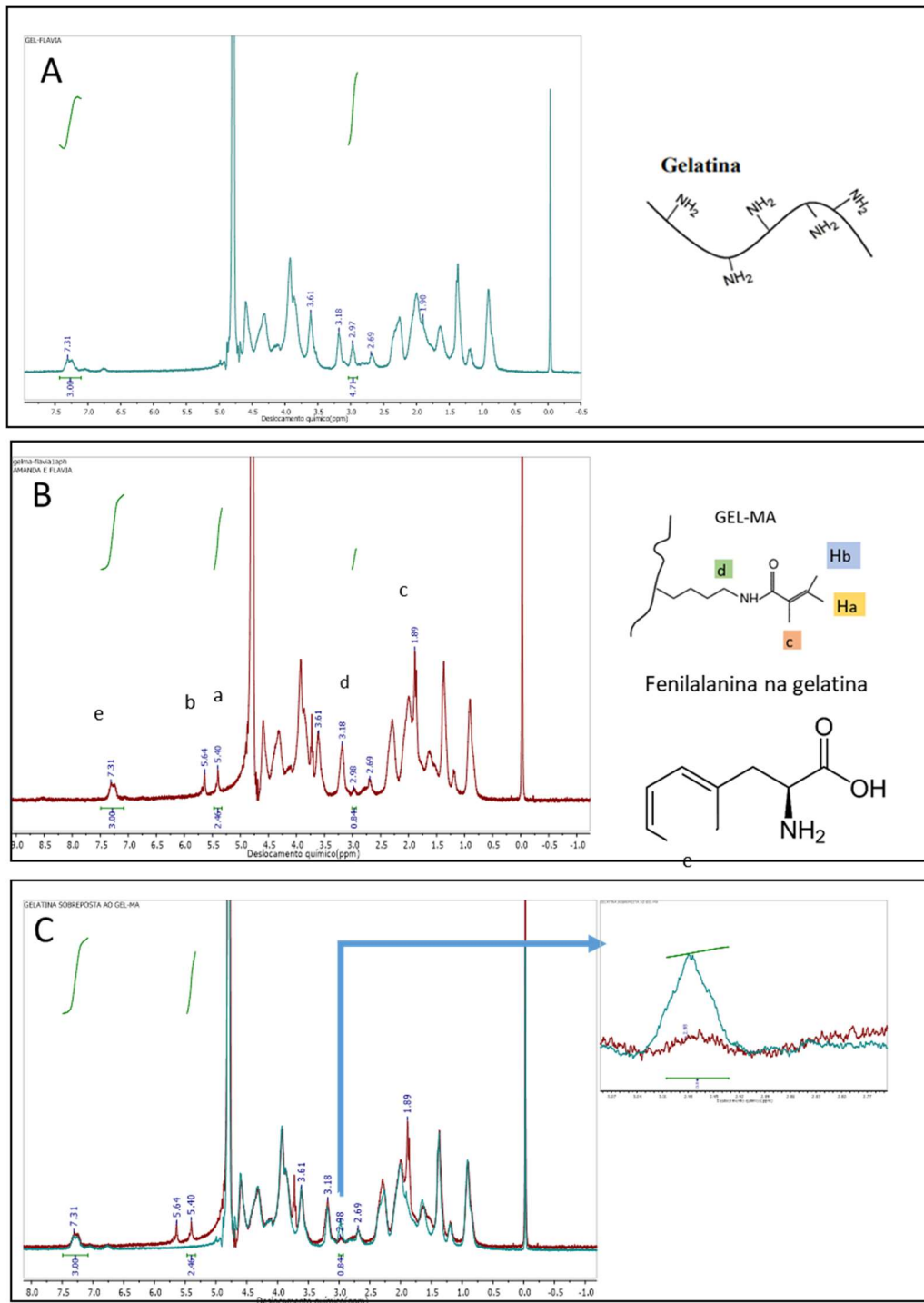


Figura 2: Ressonância magnética de prótons (^1H RMN). (A) Espectro de ^1H RMN da gelatina;. Espectro de ^1H RMN da GEL-MA;. (C) Espectro de ^1H RMN da Gelatina(azul) e da GEL-MA(vermelho) sobrepostos.

5.2 Propriedades reológicas

A viscosidade dos hidrogéis a base de GelMA foi mensurada, antes da reticulação, em função da taxa de cisalhamento e tensão de cisalhamento, os resultados médios encontram-se na Figura 3.

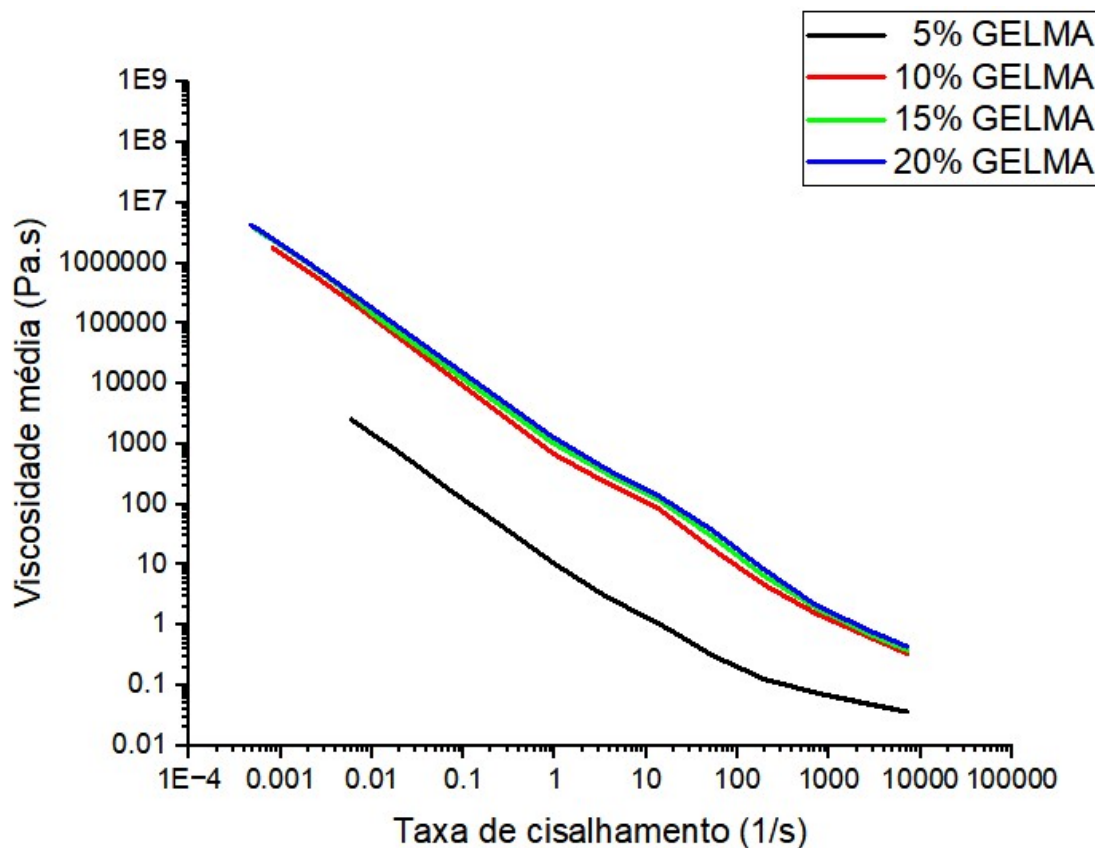


Figura 3: Viscosidade média (Pa.s) dos hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações em função da taxa de cisalhamento (1/s).

O hidrogel de menor concentração (5%) apresentou viscosidade cerca de 1 a 4 ordens de grandeza menor que as demais concentrações (10%, 15%, 20%), que foram bastante semelhantes entre si.

A curva de viscosidade x taxa de cisalhamento possibilitou o cálculo do índice de consistência (K), em Pa.s e do índice de comportamento de fluxo (n), adimensional, conforme apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Índices K e η calculados para os hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações.

Hidrogel	K	η
GEL-MA 5%	19,52±0,70	0,013±0,007
GEL-MA 10%	1394,15±87,15	0,013±0,009
GEL-MA 15%	1469,40±79,69	0,017±0,007
GEL-MA 20%	1835,79±96,24	0,017±0,007

De acordo com as curvas todos os sistemas se apresentaram como pseudoplástico, visto que quando o índice de comportamento do fluido apresentam-se com valores de $\eta < 1$.

A análise da tixotropia é dada em função da área de histerese, os dados de histerese para cada um dos hidrogéis estão apresentadas na Figura 4.

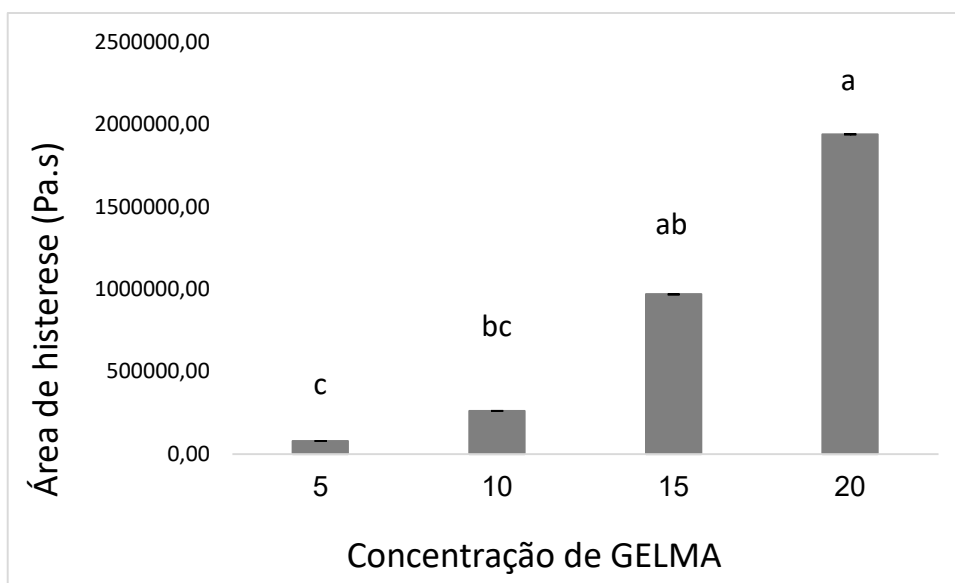


Figura 4: Média e desvio-padrão da área de histerese (Pa.s) dos hidrogéis de GelMA em diferentes concentrações. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Observa-se que as concentrações de 15 e 20% foram significativamente mais tixotropicas que a concentração de 5% e a concentração de 10% foi similar as concentrações de 5 e 15%.

Uma forte correlação linear direta ($r^2=0.98$) foi encontrada entre a tixotropia e a concentração de GelMA nos hidrogéis (Figura 5).

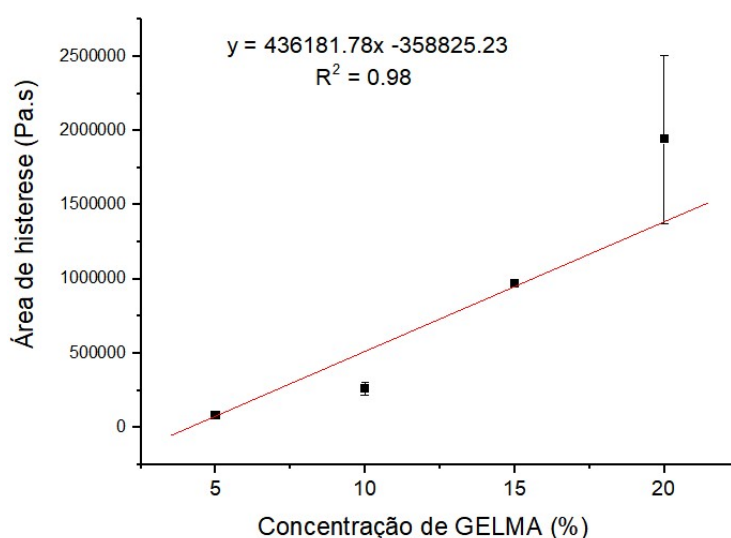


Figura 5: Correlação linear direta entre a área de histerese (Pa.s) e a concentração de GelMA.

Os dados de fotoreologia estão apresentados na tabela 3. O material com 10% GelMA apresentou maior tempo de reticulação após a incidência da luz UV que o material com 20% GelMA e o material com 15% apresentou valor similar a ambos. O material com 5% foi bastante instável durante o ensaio e até o momento só foi viável a obtenção de uma curva, por isso não foi incluído na análise estatística.

Tabela 3: Média e desvio-padrão do tempo de reticulação (s) dos hidrogéis após a fotoativação com lâmpada UV de 385nm. Letras iguais indicam ausência de diferença estatística ($p>0,05$).

Material	Tempo de reticulação (s)
GelMA 5%	7.7
GelMA 10%	5.2 ± 0.7 b
GelMA 15%	4.5 ± 0.3 ab
GelMA 20%	4.2 ± 0.2 a

5.3 Análises Biológicas

5.3.1 Adesão e Proliferação celular - AlamarBlue

A viabilidade de PDLC nos hidrogéis com 10, 15 e 20% GelMA, dada em função da redução do alamarBlue em 24h, 72h, estão apresentadas na Figura 6. Não houve diferença estatística entre os hidrogéis quanto a proliferação celular em nenhum dos tempos analisados nem em um mesmo material em função do tempo.

O hidrogel de 5% GelMA não apresentou viscosidade que viabilizasse sua manipulação a temperatura de 37°C, por isso não foi considerado no ensaio de proliferação celular.

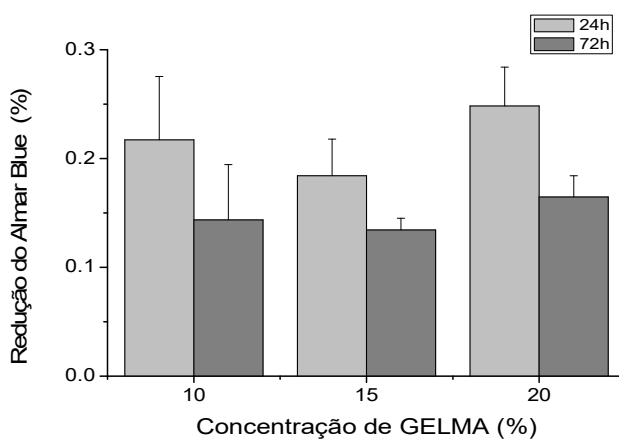


Figura 6: Média e desvio-padrão do percentual de redução do alamarBlue por células derivadas do ligamento periodontal humano em função da concentração de GelMA em 24 e 72h de cultivo.

5.3.2 Adesão e proliferação celular - CCK-8

A viabilidade de PDLC nos hidrogéis com 10, 15 e 20% GelMA, dada em função da redução do CCK-8 em 24h estão apresentadas na Figura 7. Novamente, o hidrogel com 5% GELMA não apresentou viscosidade adequada para bioimpressão em temperaturas de 4 a 22°C, por isso não foi avaliado neste ensaio. Não houve diferença estatística entre os hidrogéis quanto a proliferação celular em 24h de cultivo.

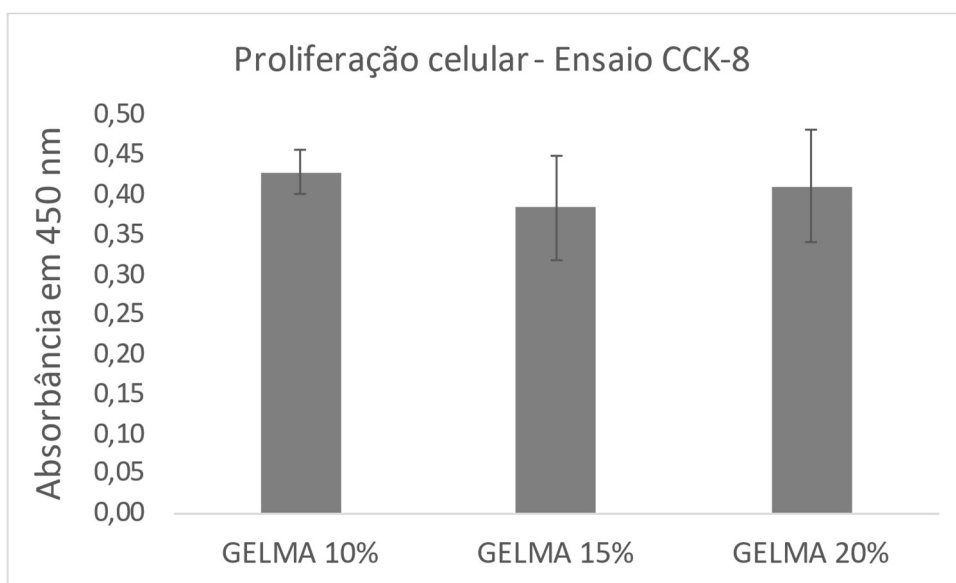


Figura 7: Média e desvio-padrão da absorbância dada pelo ensaio CCK-8 em blocos bioimpressos com células derivadas do ligamento periodontal humano em função da concentração de GelMA em 24h.

6 DISCUSSÃO

Este estudo permitiu a análise do efeito da concentração de GelMA em hidrogéis para serem usados como matrizes de suporte celular para engenharia tecidual. A hipótese nula que os hidrogéis em diferentes concentrações não apresentam diferenças quanto as propriedades reológicas, foi rejeitada visto as diferenças observadas nas três propriedades analisadas, viscosidade, fotoreologia e tixotropia. Já a hipótese nula de semelhança entre os hidrogéis na adesão e proliferação celular, foi aceita, não sendo observadas diferenças em 24 e 72h de cultivo de PDLC sobre os hidrogéis, nem em 24h de cultivo em construtos bioimpressos com biotinta de PDLC e GelMA nas diferentes concentrações.

A reação de metacilação da gelatina para síntese do GelMA foi confirmada por meio da análise de ressonância magnética nuclear de prótons. Durante a síntese, ocorre a ligação covalente entre o grupo amina (NH_2) da gelatina e o anidrido metacrílico (AM), resultando em uma ligação metacrilamida. A síntese gerou um percentual de 82% de metacilação com a adição de 2,5% de anidro metacrílico, o que é relativamente alto se comparado a outro estudo que observou 81% de metacilação com adição de 20% de anidrido metacrílico e metacilação de 54% com adição de 1,25% anidrido metacrílico (16). Embora seja esperado o aumento da metacilação da gelatina com o aumento da concentração de anidrido metacrílico na síntese, o pH da solução (35) e as condições de mistura do anidrido à gelatina, como temperatura, grau de agitação e pH podem afetar o grau de metacilação (5), o que explicaria tais diferenças. Além das condições de síntese, o tipo de gelatina também pode influenciar o grau de metacilação, estudo com gelatina do tipo B, livre de endotoxinas, relatam metacilação de 85, 90 e 100% quando o anidrido metacrilato foi adicionado 2, 2,5 ou 10 vezes em excesso em relação a concentração de aminas (11, 36).

A análise da viscosidade dos hidrogéis, mostrou uma diferença acentuada entre o material com 5% GelMA e os demais, que foram bastante similares entre eles. A menor concentração de GelMA faz com que a rede polimérica do hidrogel fique menos densa, com maior porosidade e maior

retenção de água (37) e conseqüentemente ocorra a redução da viscosidade. Estudo com GelMA em concentrações de 3 a 5% apresentou faixa de viscosidade de 75 a 2000 Pa.s em baixa taxa de cisalhamento (38) , já estudo de GelMA de 10 a 30% apresentou viscosidade na ordem de 1×10^{-3} a 1×10^{-1} Pa.s em taxas de cisalhamento de 1 a 4000 1/s à 37°C (39). Dentro os fatores que afetam a viscosidade dos hidrogéis, além da concentração dos hidrogéis, também podemos destacar a composição, o peso molecular, o grau de ramificação e a presença de aditivos (40,41).

Todos os hidrogéis testados apresentaram um comportamento pseudoplástico, ou seja, há uma redução da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, tal resultado vai ao encontro da literatura que tem demonstrado a pseudoplasticidade de hidrogéis de GelMA em concentrações de 3 a 30% GelMA (38, 39). Tal propriedade é bastante importante quando se trabalha com a bioimpressão por extrusão, pois permite que o hidrogel tenha uma baixa viscosidade, ao passar pelo bico da agulha, visto que nesta situação geram-se alta taxa de cisalhamento, protegendo as células de serem submetidas a alta tensão de cisalhamento e evitando o entupimento da agulha (40).

A análise da tensão de cisalhamento em carregamento crescente e decrescente da taxa de cisalhamento, permitiu a avaliação da tixotropia do material. A tixotropia uma propriedade reversível, onde os materiais apresentam uma pseudoplasticidade tempo dependente, ou seja, a viscosidade do material diminui em tensões cisalhantes maiores e com o passar do tempo e a viscosidade aumenta em tensões menores ou ao se remover a tensão (42, 43 ,39). A tixotropia está relacionada a capacidade do hidrogel reorganizar as ligações não-covalentes que compõem sua estrutura interna, após sofrer uma deformação, visto que esta rompe as ligações físicas, fracas presente entre as moléculas (44). Desta forma, ela é uma propriedade importante ao se considerar a bioimpressão dos hidrogéis por extrusão visto que possibilita a manutenção da forma do construto após a impressão (40, 45).

O estudo da fotoreologia permite compreender como se comporta o hidrogel na presença da luz UV, durante o processo de reticulação. Sabe-se que o tipo de fotoiniciador, sua concentração, tempo de reticulação, potência e

irradiância da lâmpada UV utilizada são fatores que interferem diretamente na densidade da rede polimérica formada, e em propriedades físico-químicas como resistência a compressão, entumescimento, taxa de degradação entre outras (46, 47). O fotoiniciador lithium phenyl-2,4,6 trimethylbenzoylphosphinate (LAP) tem sido comparado ao Irgacure 2959 em hidrogéis de GelMA e apresentado menor citotoxicidade em maiores concentração e maior cinética de polimerização, aumentando a estabilidade e fidelidade de impressão (38, 48). De fato, no presente estudo uma rápida fotoreticulação foi observada nos materiais, necessitando de menos de 10s de exposição a luz UV.

Grande parte da popularidade de hidrogéis a base de GelMA dá-se devido sua alta biocompatibilidade celular (5), diversos estudos têm mostrado altas taxas de proliferação celular em matrizes de GelMA (22, 39, 49). Estudo que avaliou hidrogéis de GelMA em concentrações de 10, 20 e 30% observaram que nenhuma das concentrações foi citotóxica, mas com o aumento da concentração há um aumento do número de células aderidas (formato achatado) pela maior disponibilidade de grupamentos RGD para adesão celular, enquanto que em concentração de 10%, muitas células encontram-se retidas mas não aderidas (formatos arredondados) em 1 e 6 dias de cultivo (39). Por outro lado, estudo com concentrações de 5, 10 e 15% GelMA mostrou que a concentração de 5% apresentou maior taxa de proliferação celular devido a maior porosidade do hidrogel em 7 dias de cultivo (37). O presente estudo por sua vez, não apresentou diferença entre os grupos em 1 e 3 dias de cultivo. Tais divergências, podem ser associadas ao tipo de fotoiniciador usado, tempo de exposição das células a luz UV e tipo celular usada, que divergiram em todos os estudos.

Diante dos métodos usados nesse estudo para a análise de proliferação celular (alamarblue e CCK-8), observou-se que a proliferação celular após 24h foi similar entre os grupos, indicando que o processo de bioimpressão em si não favoreceu ou prejudicou nenhum grupo específico. O uso de radiação UV para reticulação dos materiais por 30s também não se mostrou nocivo, não afetando a viabilidade celular das amostras.

Estudo comparando a proliferação celular em hidrogel de 10% GelMA, com inclusão das células por bioimpressão ou plaqueamento e fotoativados por 15, 30 ou 60s, mostrou que no dia 1, os materiais com 60s fotoativação apresentaram menor proliferação celular, no dia 4, os materiais bioimpressos e fotoativados por 60s ainda apresentavam menor proliferação celular, porém os plaqueados diretamente no hidrogel, não apresentam diferenças. Já em 8 dias, não houve diferenças entre os tempos de exposição à luz UV (49).

A produção e bioimpressão de hidrogéis de gelatina são áreas de pesquisa altamente promissoras, mas não isentas de desafios técnicos e biológicos substanciais. A abordagem cuidadosa dessas limitações é fundamental para avanços significativos na medicina regenerativa e engenharia de tecidos. A viscosidade da solução de gelatina surge como um ponto sensível. A precisão de condições térmicas durante a síntese do hidrogel e sua bioimpressão se mostrou fundamental para obter uma viscosidade e homogeneidade adequada, o que requer uma cuidadosa calibração das formulações e condições de processamento, onde há necessidade de atingir as temperaturas ideais em cada etapa, o que acabou se tornando um processo demorado. E ao se analisar a proliferação celular, a esterilização e a manutenção da biocompatibilidade são aspectos incontornáveis. O processo de esterilização deve ser meticulosamente conduzido para garantir a segurança e a eficácia dos hidrogéis produzidos. Neste estudo o processo prévio de esterilização do GelMA liofilizado e sua manipulação em fluxo laminar para síntese do hidrogel, garantiu a ausência de contaminação da amostra, sendo um método efetivo para alcançarmos a esterilidade para o cultivo *in vitro*.

7 CONCLUSÃO

De acordo com o exposto e considerando as limitações deste estudo, podemos concluir que: (1) neste estudo foi possível sintetizar GelMA com alta taxa de metacrilção e produzir hidrogéis de 5, 10, 15 e 20% GelMA; (2) hidrogel de 5% GelMA apresentou menor viscosidade que hidrogéis com 10, 15 e 20% GelMA e não foi passível de fotoreticulação. As demais concentrações foram passíveis de reticulação em tempo inferior a 10s. Todos hidrogéis apresentaram-se pseudoplásticos e tixotrópicos, tendo uma relação direta entre tixotropia e a concentração de GelMA. (3) As concentrações avaliadas (10, 15 e 20%) apresentaram proliferação celular similar tanto quando PDLC foram semeadas sobre os hidrogéis como quando foram bioimpressas com os hidrogéis.

Diante disso, podemos indicar o hidrogel com 20% GelMA como o mais promissor para avaliação da bioimpressão para engenharia óssea, dada sua maior tixotropia e similar biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

- (1) Carvalho ACA de, Pereira E dos SC, Costa C, Barreto IC, Madureira LC, Paim FR. Bioengineered tissue regenerative strategies and ethical aspects. *Journal of Medical and Biological Sciences*. 2010Nov; 9(1):20-7.
- (2) Oliveira CS, Nascimento M, de Almeida Junior E, Crusoé M, Bahia P, Rosa FP. Advances and applications of tissue bioengineering. *Journal of Medical and Biological Sciences*. 2010 Nov; 9(1):28-36.
- (3) Casagrande L, Lauxen IS, Fernandes MI. The use of tissue engineering in dentistry. *R. Fac. Odontol. Porto Alegre*. 2009 Jan. 23 50(1):20-3.
- (4) É G do N do, Peduti GP, Carvalho AML de, Rabelo A dos S, Diniz MC. Tissue and Organ 3D Bioprinting: a technological prospection. *Cadernos de Prospecção*. 2020Oct.; 13(5):1383.
- (5) 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.
- (6) Xiao S, Zhao T, Wang J, Wang C, Du J, Ying L, Lin J, Zhang C, Hu W, Wang L, Xu K. Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Rev Rep*. 2019 Oct;15(5):664-679.
- (7) Alam, K., Iqbal, M., Hasan, A., Al-Maskari, N. Rheological Characterization of Biological Hydrogels in Aqueous State. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2020; 7(3): 171-175.
- (8) Dong Z, Yuan Q, Huang K, Xu W, Liu G, Gu Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)-based biomaterials for bone regeneration. *RSC Adv*. 2019 Jun 5;9(31):17737-17744.
- (9) 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 (Basel)*. 2018 Nov 21;10(11):1290.
- (10) Goto R, Nishida E, Kobayashi S, Aino M, Ohno T, Iwamura Y, Kikuchi T, Hayashi JI, Yamamoto G, Asakura M, Mitani A. Gelatin Methacryloyl-Riboflavin (GelMA-RF) Hydrogels for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 6;22(4):1635.
- (11) Hoch E , Hirth T , Tovar GEM , Borchers K . Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting. *J Mater Chem B*. 2013 Nov 7;1(41):5675-5685.
- (12) Peyret C, Elkhoury K, Bouguet-Bonnet S, Poinsignon S, Boulogne C, Giraud T, Stefan L, Tahri Y, Sanchez-Gonzalez L, Linder M, Tamayol A, Kahn CJF, Arab-Tehrany E. Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogel Scaffolds: Predicting Physical Properties Using an Experimental Design Approach. *Int J Mol Sci*. 2023 Aug 29;24(17):13359.

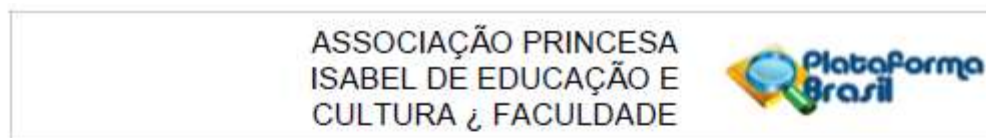
- (13) Zhao X, Lang Q, Yildirimer L, Lin ZY, Cui W, Annabi N, Ng KW, Dokmeci MR, Ghaemmaghami AM, Khademhosseini A. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2016 Jan 7;5(1):108-18
- (14) Schuurman W, Levett PA, Pot MW, van Weeren PR, Dhert WJ, Hutmacher DW, Melchels FP, Klein TJ, Malda J. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol Biosci.* 2013 May;13(5):551-61.
- (15) Lee Y, Lee JM, Bae PK, Chung IY, Chung BH, Chung BG. Photocrosslinkable hydrogel-based 3D microfluidic culture device. *Electrophoresis.* 2015 Apr;36(7-8):994-1001.
- (16) 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.
- (17) Li H, Tan YJ, Liu S, Li L. Three-Dimensional Bioprinting of Oppositely Charged Hydrogels with Super Strong Interface Bonding. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018 Apr 4;10(13):11164-11174.
- (18) Van Den Bulcke AI, Bogdanov B, De Rooze N, Schacht EH, Cornelissen M, Berghmans H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules.* 2000 Spring;1(1):31-8.
- (19) Mancha Sánchez E, Gómez-Blanco JC, López Nieto E, Casado JG, Macías-García A, Díaz Díez MA, Carrasco-Amador JP, Torrejón Martín D, Sánchez-Margallo FM, Pagador JB. Hydrogels for Bioprinting: A Systematic Review of Hydrogels Synthesis, Bioprinting Parameters, and Bioprinted Structures Behavior. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 Aug 6;8:776.
- (20) Byambaa B, Annabi N, Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Jia W, Kazemzadeh-Narbat M, Shin SR, Tamayol A, Khademhosseini A. Bioprinted Osteogenic and Vasculogenic Patterns for Engineering 3D Bone Tissue. *Adv Healthc Mater.* 2017 Aug;6(16).
- (21) Klotz BJ, Gawlitta D, Rosenberg AJWP, Malda J, Melchels FPW. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol.* 2016 May;34(5):394-407.
- (22) Huang B, Li P, Chen M, Peng L, Luo X, Tian G, Wang H, Wu L, Tian Q, Li H, Yang Y, Jiang S, Yang Z, Zha K, Sui X, Liu S, Guo Q. Hydrogel composite scaffolds achieve recruitment and chondrogenesis in cartilage tissue engineering applications. *J Nanobiotechnology.* 2022 Jan 6;20(1):25.
- (23) Celikkin N, Mastrogiacomo S, Jaroszewicz J, Walboomers XF, Swieszkowski W. Gelatin methacrylate scaffold for bone tissue engineering: The influence of polymer concentration. *J Biomed Mater Res A.* 2018 Jan;106(1):201-209.
- (24) Ansari S, Sarrion P, Hasani-Sadrabadi MM, Aghaloo T, Wu BM, Moshaverinia A. Regulation of the fate of dental-derived mesenchymal stem cells using engineered alginate-GelMA hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2017 Nov;105(11):2957-2967

- (25) Fairbanks BD, Schwartz MP, Bowman CN, Anseth KS. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility. *Biomaterials*. 2009 Dec;30(35):6702-7.
- (26) Rehman SRU, Augustine R, Zahid AA, Ahmed R, Tariq M, Hasan A. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. *Int J Nanomedicine*. 2019 Dec 5; 14:9603-9617.
- (27) Isaeva EV, Kisel AA, Beketov EE, Demyashkin GA, Yakovleva ND, Lagoda TS, Arguchinskaya NV, Baranovsky DS, Ivanov SA, Shegay PV, Kaprin AD. Effect of Collagen and GelMA on Preservation of the Costal Chondrocytes' Phenotype in a Scaffold *in vivo*. *Sovrem Tekhnologii Med*. 2023;15(2):5-16.
- (28) Zhang J, Zeng Z, Chen Y, Deng L, Zhang Y, Que Y, Jiao Y, Chang J, Dong Z, Yang C. 3D-printed GelMA/CaSiO₃ composite hydrogel scaffold for vascularized adipose tissue restoration. *Regen Biomater*. 2023 May 8;10:rba049.
- (29) Jiang G, Li S, Yu K, He B, Hong J, Xu T, Meng J, Ye C, Chen Y, Shi Z, Feng G, Chen W, Yan S, He Y, Yan R. A 3D-printed PRP-GelMA hydrogel promotes osteochondral regeneration through M2 macrophage polarization in a rabbit model. *Acta Biomater*. 2021 Jul 1;128:150-162
- (30) Shen M, Wang L, Gao Y, Feng L, Xu C, Li S, Wang X, Wu Y, Guo Y, Pei G. 3D bioprinting of in situ vascularized tissue engineered bone for repairing large segmental bone defects. *Mater Today Bio*. 2022 Aug 8;16:100382.
- (31) Cao Y, Yang S, Zhao D, Li Y, Cheong SS, Han D, Li Q. Three-dimensional printed multiphase scaffolds with stratified cell-laden gelatin methacrylate hydrogels for biomimetic tendon-to-bone interface engineering. *J Orthop Translat*. 2020 Feb 8;23:89-100.
- (32) Khayat A, Monteiro N, Smith EE, Pagni S, Zhang W, Khademhosseini A, Yelick PC. GelMA-Encapsulated hDPSCs and HUVECs for Dental Pulp Regeneration. *J Dent Res*. 2017 Feb;96(2):192-199.
- (33) Kirsch M, Birnstein L, Pepelanova I, Handke W, Rach J, Seltsam A, Scheper T, Lavrentieva A. Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Formulated with Human Platelet Lysate Supports Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation and Enhances the Hydrogel's Mechanical Properties. *Bioengineering (Basel)*. 2019 Aug 28;6(3):76.
- (34) Cai J, Zhang H, Hu Y, Huang Z, Wang Y, Xia Y, Chen X, Guo J, Cheng H, Xia L, Lu W, Zhang C, Xie J, Wang H, Chai R. GelMA-MXene hydrogel nerve conduits with microgrooves for spinal cord injury repair. *J Nanobiotechnology*. 2022 Oct 28;20(1):460.
- (35) Shirahama H, Lee BH, Tan LP, Cho NJ. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Sci Rep*. 2016 Aug 9; 6:31036.
- (36) Tytgat L, Markovic M, Qazi TH, Vagenende M, Bray F, Martins JC, Rolando C, Thienpont H, Ottevaere H, Ovsianikov A, Dubruel P, Van Vlierberghe S. Photo-crosslinkable recombinant collagen mimics for tissue engineering applications. *J Mater Chem B*. 2019 May 15;7(19):3100-3108.

- (37) Xu P, Guan J, Chen Y, Xiao H, Yang T, Sun H, Wu N, Zhang C, Mao Y. Stiffness of photocrosslinkable gelatin hydrogel influences nucleus pulposus cell properties *in vitro*. *J Cell Mol Med*. 2021 Jan;25(2):880-891.
- (38) Liu W, Heinrich MA, Zhou Y, Akpek A, Hu N, Liu X, Guan X, Zhong Z, Jin X, Khademhosseini A, Zhang YS. Extrusion Bioprinting of Shear-Thinning Gelatin Methacryloyl Bioinks. *Adv Healthc Mater*. 2017 Jun;6(12):10.1002
- (39) Hoch E, Schuh C, Hirth T, Tovar GE, Borchers K. Stiff gelatin hydrogels can be photo-chemically synthesized from low viscous gelatin solutions using molecularly functionalized gelatin with a high degree of methacrylation. *J Mater Sci Mater Med*. 2012 Nov;23(11):2607-17.
- (40) Deo KA, Singh KA, Peak CW, Alge DL, Gaharwar AK. Bioprinting 101: Design, Fabrication, and Evaluation of Cell-Laden 3D Bioprinted Scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2020 Mar;26(5-6):318-338.
- (41) Jia J, Richards DJ, Pollard S, Tan Y, Rodriguez J, Visconti RP, Trusk TC, Yost MJ, Yao H, Markwald RR, Mei Y. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta Biomater*. 2014 Oct;10(10):4323-31.
- (42) Ghica MV, Hîrjău M, Lupuleasa D, Dinu-Pîrvu CE. Flow and Thixotropic Parameters for Rheological Characterization of Hydrogels. *Molecules*. 2016 Jun 16;21(6):786.
- (43) Pramanik B. Short Peptide-Based Smart Thixotropic Hydrogels. *Gels*. 2022 Sep 7;8(9):569.
- (44) Zhuang P, Ng WL, An J, Chua CK, Tan LP. Layer-by-layer ultraviolet assisted extrusion-based (UAE) bioprinting of hydrogel constructs with high aspect ratio for soft tissue engineering applications. *PLoS One*. 2019 Jun 12;14(6): e0216776.
- (45) Zhuang P, Greenberg Z, He M. Biologically enhanced starch bio-ink for promoting 3D cell growth. *Adv Mater Technol*. 2021 Dec;6(12):2100551.
- (46) Im GB, Lin RZ. Bioengineering for vascularization: Trends and directions of photocrosslinkable gelatin methacrylate hydrogels. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022 Nov 17;10:1053491.
- (47) Leu Alexa R, Iovu H, Ghitman J, Serafim A, Stavarache C, Marin MM, Ianchis R. 3D-Printed Gelatin Methacryloyl-Based Scaffolds with Potential Application in Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. 2021 Feb 27;13(5):727.
- (48) Tigner TJ, Rajput S, Gaharwar AK, Alge DL. Comparison of Photo Cross Linkable Gelatin Derivatives and Initiators for Three-Dimensional Extrusion Bioprinting. *Biomacromolecules*. 2020 Feb 10;21(2):454-463.
- (49) Bertassoni LE, Cardoso JC, Manoharan V, Cristino AL, Bhise NS, Araujo WA, Zorlutuna P, Vrana NE, Ghaemmaghami AM, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. *Biofabrication*. 2014 Jun;6(2):024105.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP

Parecer Consubstanciado do CEP –Plataforma Brasil (CAAE: 68449423.9.0000.0081)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Engenharia tecidual óssea e periodontal - desenvolvimento de membranas híbridas bioativas

Pesquisador: MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 04312818.0.0000.5597

Instituição Proponente: Associação Princesa Isabel de Educação e Cultura

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.095.848

Apresentação do Projeto:

Este projeto de pesquisa busca o desenvolvimento de membranas híbridas bioativas para utilização na engenharia tecidual óssea e periodontal. O projeto apresenta-se bem descrito e não fere nenhum preceito ético.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos do presente estudo são: (1) sintetizar matrizes de suporte celular híbridas e bioativas, voltadas a regeneração óssea, pela associação de poli-L-Lactídeo, vitamina D, dexametasona, hidroxiapatita e fosfato octacálcico em concentrações e proporções diversas; (2) caracterizar as matrizes de suporte celular desenvolvidas quanto às suas características morfológicas, capacidade de adesão e crescimento celular, propriedades de osteocondução e de osteoindução.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão bem descritos. O risco ao paciente é mínimo, relacionado apenas ao desconforto do procedimento cirúrgico da retirada do dente. Entretanto a necessidade cirúrgica é independente da realização da pesquisa. Não haverá risco ou desconforto ao paciente devido à coleta das células, uma vez que as células, só serão retiradas do dente após a remoção do mesmo ser concluída e o paciente liberado.

Em relação aos benefícios, não são diretos ao paciente, mas relacionados para o desenvolvimento de

Endereço: Av. Interlagos, 1.329 - 4o andar - Interlagos
Bairro: JARDIM UMUARAMA **CEP:** 04.661-100
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)9818-7818 **E-mail:** susanamortomoto@yahoo.com.br

ASSOCIAÇÃO PRINCESA
ISABEL DE EDUCAÇÃO E
CULTURA & FACULDADE



Continuação do Parecer: 3.095.848

novos materiais para uso odontológico, para no futuro, propiciar tratamentos odontológicos mais seguros e eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa não fere preceitos éticos e respeita a legislação vigente quanto a segurança e anonimato dos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado todos os termos e cartas obrigatórias de acordo com o necessário para a realização do estudo (declaração de uso da clínica e laboratório de pesquisa) e coerente com a linguagem dos participantes (TCLE).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se apto para ser realizado, uma vez que se enquadra dentro dos aspectos éticos previstos na legislação. Não há pendências ou modificações necessárias.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao COEPE-UNIB relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final via Plataforma Brasil. Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação. Recomendações: Não foram observados impedimentos éticos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1285180.pdf	06/12/2018 11:13:33		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	06/12/2018 11:12:34	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TCP.pdf	06/12/2018 11:12:22	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaousoclinica.pdf	06/12/2018 11:12:03	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	06/12/2018 11:11:39	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	tissueproj.pdf	06/12/2018 10:33:49	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito

Endereço: Av. Interlagos, 1.329 - 4o andar - Interlagos
 Bairro: JARDIM UMUARAMA CEP: 04.661-100
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)9818-7818 E-mail: susanamortoto@yahoo.com.br

ASSOCIAÇÃO PRINCESA
ISABEL DE EDUCAÇÃO E
CULTURA & FACULDADE



Continuação do Parecer: 3.095.848

Cronograma	cronogram.pdf	06/12/2018 10:33:40	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	histologia.pdf	29/11/2018 09:11:03	MARCO ANTÔNIO RIGO RODRIGUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 19 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Fernanda Waeny
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Interlagos, 1.329 - 4o andar - Interlagos
Bairro: JARDIM UMUARAMA CEP: 04.661-100
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)9818-7518 E-mail: susanamortomoto@yahoo.com.br