

GABRIELA SOARES KRONEMBERGER

BIOFABRICAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS
TRONCO/ESTROMAIS MESENQUIMAIS E SUA SEMEADURA EM
ARCABOUÇOS 3D IMPRESSOS COMO UMA NOVA
ABORDAGEM PARA A REGENERAÇÃO DE LESÕES ÓSSEAS
CRÍTICAS

DUQUE DE CAXIAS, RJ

Setembro, 2021

GABRIELA SOARES KRONEMBERGER

BIOFABRICAÇÃO DE ESFEROIDES DE CÉLULAS
TRONCO/ESTROMAIS MESENQUIMAIS E SUA SEMEADURA EM
ARCABOUÇOS 3D IMPRESSOS COMO UMA NOVA
ABORDAGEM PARA A REGENERAÇÃO DE LESÕES ÓSSEAS
CRÍTICAS

Tese apresentada ao programa
de pós-graduação em
Biomedicina Translacional da
Universidade do Grande Rio para
obtenção do título de Doutora em
Ciências.

Orientadora: Dra. Leandra Santos Baptista

Co-orientador: Dr. Daniel J. Kelly

DUQUE DE CAXIAS, RJ

Setembro, 2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE
BIBLIOTECAS

K93b Kronemberger, Gabriela Soares.

Biofabricação de esferoides de células tronco/estromais mesenquimais e sua semeadura em arcabouços 3D impressos como uma nova abordagem para a regeneração de lesões ósseas críticas / Gabriela Soares Kronemberger. – Duque de Caxias, 2021.

268 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2021.

“Orientadora: Prof. Dra. Leandra Santos Baptista

Coorientador: Prof. Dr. Daniel J. Kelly”.

Referências: f. 234-260.

1. Biomedicina. 2. Tecido ósseo. 3. Células-tronco. 4. Esferoides celulares. 5. Osteogênese. 6. Regeneração óssea. 7. Bioimpressão 3D. I. Baptista, Leandra Santos. II. Kelly, Daniel J. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

ATA DE APROVAÇÃO



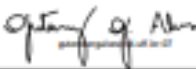
ATA DE DEFESA DE TESE

Às 09:00 horas, do dia 29 de setembro de 2021, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão, em ambiente virtual, de Defesa da Tese intitulada "Biofabricação de esferoides de células tronco/estromais mesenquimais e sua semeadura em arcabouços 3D impressos como uma nova abordagem para a regeneração de lesões ósseas críticas", de autoria de Gabriela Soares Kronenberger, aluna do Doutorado, sob orientação da Professora Leandra Santos Baptista. A sessão foi aberta pelo Prof. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Gutemberg Gomes Alves, Prof. Rodrigo Alvarenga Resende, Prof. Luciano Paulino da Silva e Prof. Leandra Santos Baptista. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **satisfatórias**.

O presidente declarou a doutoranda Gabriela Soares Kronenberger **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UEZO. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

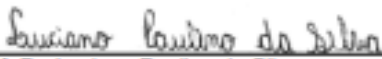
Duque de Caxias, 29 de setembro de 2021.

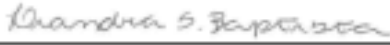

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO
Presidente da Banca


Prof. Dr. Gutemberg Gomes Alves
Universidade Federal Fluminense -
UFF

GUTEMBERG
GOMES ALVES
Assinado eletronicamente por
GUTEMBERG GOMES ALVES
Data: 2021.09.29 19:27:04
CPF: 07324043705
0000


Prof. Dr. Rodrigo Alvarenga Resende
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA


Prof. Dr. Leandra Santos Baptista
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO


Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
BIOTRANS

Dedico este trabalho, com amor, à minha família:
José Adão, Heloisa, Catarina e Thais,
pelo apoio, incentivo e carinho incondicionais.

COMISSÃO JULGADORA

Titulares

Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho (INMETRO)

Dr. Gutemberg Gomes Alves (UFF)

Dr. Rodrigo Alvarenga Rezende (UNIARA)

Dr. Luciano Paulino da Silva (EMBRAPA)

Orientadora

Dra. Leandra Santos Baptista (UFRJ)

Co-orientador

Dr. Daniel J. Kelly (TCD, Dublin, Irlanda)

Suplentes

Interno: Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira (INMETRO)

Externo: Dr. Kléber Luiz de Araújo e Souza (UFRJ)

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Leandra Baptista que me aceitou em seu grupo de pesquisa desde o mestrado e que me inspira todos os dias a ser uma aluna melhor, mais dedicada e mais atenta aos principais objetivos da ciência. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por todos os ensinamentos, “puxões de orelha”, conselhos, oportunidades, disponibilidade e preocupação para que a minha formação acadêmica fosse a melhor possível. Me sinto privilegiada por ter você como orientadora e amiga nessa jornada. Muito obrigada por tudo, de verdade!

Ao meu co-orientador, professor Dr. Daniel Kelly que me recebeu em seu laboratório no *Trinity Biomedical Sciences Institute* (Trinity College of Dublin, Dublin, Irlanda) por um ano do meu doutoramento e contribuiu de forma substancial para a minha formação científica, pessoal e para o desenvolvimento desta tese. Obrigada por sempre se preocupar e estar disponível para que a minha experiência em seu laboratório fosse completa e que, além disso, para que eu tivesse tudo que fosse necessário para desenvolver o projeto.

A todos os membros do nosso querido grupo CTAB: Ísis, Renata, Taisnara, Guilherme, Bianca, Tathiana, Mateus, Mariana, Isabelle, Danielle, Rosangela e Anderson por toda ajuda, apoio e conhecimento compartilhado durante esses anos de trabalho. Obrigada por fazerem a rotina laboratorial mais divertida e pelo trabalho em equipe exemplar que prova que não é possível fazer ciência sozinho!

A todos os servidores (em especial, ao professor Dr. José Mauro Granjeiro e Dr. Leonardo Boldrini), técnicos e alunos do Laboratório de Bioengenharia do INMETRO (em especial aos meus colegas Chayenne Santos, Bianca Marigliani, Priscila Grion e Wanderson Studzel) e do NUMPEX-BIO na UFRJ – Polo Xerém, por estarem presentes e muito dispostos a ajudar nos meus experimentos. Em especial, agradeço ao técnico Brunno Verçosa do NUMPEX-BIO, pela paciência e conhecimento repassado no microscópio eletrônico de varredura.

Ao Dr. Ross Burdis do laboratório no *Trinity Biomedical Sciences Institute*, que foi meu mentor e parceiro no desenvolvimento do nosso projeto durante meu período em Dublin. Não tenho palavras para agradecer por todos os ensinamentos, pela paciência e generosidade diárias! Tenho uma admiração imensa pelo cientista que você é e serei para sempre grata por tudo que você fez por mim desde o nosso primeiro dia de trabalho juntos. Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos Grace Brogan e Alexandre Dufour que me receberam no laboratório no *Trinity Center of Biomedical Engineering* (TCBE) e tornaram a minha jornada em Dublin possível através da amizade, companheirismo, risadas e apoio diários. Grace, obrigada por sempre estar comigo em todos os momentos desde o nosso primeiro dia juntas, por todas as conversas, por sempre ter uma solução para os problemas com um sorriso no rosto e pelos infinitos conselhos. Alex ou ‘french boy’, não sei o que teria acontecido se você não tivesse se preocupado em me acolher desde o primeiro momento que você me viu. Vou ser para sempre grata por você me apoiar, por ter me defendido quando necessário

e por ter estado ao meu lado todos os dias. Aos dois, obrigada por serem esses amigos incríveis e colegas de trabalho admiráveis!

A todos os membros do TCBE e *J&J lab* que tornaram os meus dias ensolarados em Dublin! Muito obrigada por sempre estarem dispostos para ajudar em tudo o que eu precisei com tanta atenção e paciência. Em especial, agradeço ao Xavi Barceló, Inês Fonseca, Angélica Federici, Conor O'Kneffe, Shani Samuel, Selcen Guler, Nadia Rodriguez, Ian Whelan e Farhad Chariyev.

Aos membros da banca pelo aceite do convite para participar da avaliação e revisão deste trabalho.

A coordenação, professores e funcionários do programa de pós-graduação em biomedicina translacional (BIOTRANS) que tanto contribuíram para a minha formação acadêmica desde o mestrado.

Ao Dr. Alexandre Rossi e ao Thiago Palhares do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) pela colaboração no desenvolvimento dos biomateriais utilizados neste trabalho.

Ao Dr. André Rossi e a Dra. Gisele Dalmônico pela colaboração nas análises ultraestruturais desenvolvidas no CBPF.

A todos os pesquisadores, alunos e técnicos do Laboratório de Experimentação Animal (LEA) e do Laboratório Associado de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO) na Universidade Federal Fluminense (UFF) pelo cuidado ímpar, atenção e colaboração com os estudos pré-clínicos desenvolvidos neste trabalho. Em especial, agradeço muito à Dra. Mônica Calasans, Dr. Rodrigo Rezende, Dr. Marcelo Uzeda, Dra. Adriana Terezinha Novellino e Dra. Suellen Sartoretto.

A CAPES pela bolsa de doutorado e pela bolsa do programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE). A FAPERJ e ao CNPq pela verba para a execução dos experimentos deste projeto.

A Deus que é força e refúgio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus amados e queridos pais, José Adão e Heloisa que são meu alicerce e maior exemplo em todos os passos do meu caminho. Obrigada por sempre me amarem incondicionalmente, por me apoiarem em todas as minhas decisões e por sempre terem colocado a educação como prioridade máxima em nossa casa. Às minhas queridas e amadas irmãs, Catarina e Thais que me criaram com tanto amor, por terem me ensinado tudo o que eu sei hoje e por serem as minhas melhores amigas e companheiras nesta vida.

Aos meus familiares e amigos por todo o apoio, carinho e torcida nessa jornada!

“Se você ouvir uma voz dentro de você dizer: 'Você não pode pintar', então, por suposto, pinte e essa voz será silenciada. “
(Vincent Van Gogh)

“O sucesso não é final, o fracasso não é fatal: é a coragem de continuar que conta. ”
(Winston Churchill)

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação. “
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

KRONEMBERGER, Gabriela Soares. Biofabricação de esferoides de células tronco/estromais mesenquimais e sua semente em arcabouços 3D impressos como uma nova abordagem para a regeneração de lesões ósseas críticas. Duque de Caxias, 2021. Tese (Doutorado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2021.

A nova formação do tecido ósseo é desejável em uma variedade de cenários clínicos. Para uma regeneração óssea eficiente, é esperado que a vascularização no local da lesão seja restaurada de forma funcional. Células-tronco/estromais mesenquimais derivadas da medula óssea (bmMSCs, *do inglês, bone marrow mesenchymal stem cells*) e derivadas do tecido adiposo (ASCs, *do inglês, adipose derived stem/stromal cells*) são consideradas fontes celulares promissoras para a formação deste tecido *in vitro*. Uma nova abordagem na área de Engenharia de Tecidos corresponde à utilização de esferoides para fabricar tecidos biológicos *in vitro* e associar esses esferoides com arcabouços funcionalizados. Dessa forma, o objetivo da parte A deste trabalho foi associar esferoides de ASCs com um arcabouço impresso 3D de poli (ácido láctico)/carbonato apatita (PLA/CHA) como uma nova abordagem para promover a regeneração óssea em modelo pré-clínico. Inicialmente, foi realizada a indução à diferenciação osteogênica por hipertrofia em esferoides de ASCs. Os esferoides induzidos, em duas semanas, apresentaram alta expressão de mRNA de genes relacionados a hipertrofia. Quando submetidos ao processo de fusão *in vitro*, os esferoides induzidos, apresentaram um aumento progressivo de depósitos de cálcio extracelular e alta positividade para colágeno I e osteocalcina. Em seguida, os esferoides de ASCs foram semeados na superfície dos arcabouços de PLA/CHA *in vitro* e implantados em modelo de defeito ósseo crítico em calvária de ratos. Foi observado a formação de tecido ósseo novo na região central do defeito. O objetivo principal da parte B foi desenvolver um construído funcional *in vitro* contendo uma parte vascular, como abordagem de pré-vascularização para a engenharia óssea. Inicialmente, os esferoides de bmMSCs foram induzidos a hipertrofia. Em seguida, foi realizada a fabricação de esferoides de vasculares de co-cultivo, a partir de diferentes proporções de HUVECs:bmMSCs. Após esta etapa, os esferoides induzidos para a hipertrofia e vasculares fabricados, foram semeados em arcabouço 3D impresso de policaprolactona (PCL) bioativo. Os construídos foram mantidos em sistema dinâmico de bioreator e apresentaram elevada capacidade de fusão, densidade e produção de matriz extracelular de cartilagem funcional. Em seguida, foi feito o implante dos construídos em defeito subcutâneo de camundongos e a partir das análises macroscópicas, foi observada a formação de tecido novo. Por fim, os esferoides vasculares de co-cultivo foram bioimpressos, a partir da técnica de extrusão e não apresentaram prejuízo em seu diâmetro, morfologia e viabilidade celular. Em conclusão, todas as abordagens em Engenharia de Tecidos desenvolvidas nesta tese foram realizadas para a biofabricação de tecido ósseo e apresentam potencial para translação no futuro. Em adição, essas abordagens podem convergir para a estratégia de bioimpressão 3D, considerada inovadora em território nacional e internacional.

Palavras-chave: tecido ósseo, células-tronco/estromais mesenquimais, esferoides, fusão, osteogênese, arcabouço 3D, vascularização, bioimpressão 3D, regeneração óssea.

ABSTRACT

KRONEMBERGER, Gabriela Soares. Biofabrication of mesenchymal stem/stromal cell spheroids and their seeding in 3D printed scaffolds as a new approach for the regeneration of critical-size bone defects. Duque de Caxias, 2021. Thesis (Doctorate in Translational Biomedicine) - Postgraduate Program in Translational Biomedicine, University of Grande Rio, Duque de Caxias, 2021.

New bone formation is desirable in a variety of clinical settings. For an efficient bone regeneration, it is expected that the vascularization at the lesion site will be restored in a functional way. Mesenchymal stem/stromal cells derived from bone marrow (bmMSCs) and derived from adipose tissue (ASCs, adipose derived stem/stromal cells) are considered promising cellular sources for the formation of this tissue *in vitro*. A new approach in the field of Tissue Engineering corresponds to use spheroids to fabricate biological tissues *in vitro* and then, to seed these spheroids on the surface of scaffolds. Therefore, the aim of part A was to associate ASCs spheroids with a 3D printed poly (lactic acid)/carbonate apatite (PLA/CHA) scaffold as a new approach to promote bone regeneration. Initially, ASC spheroids were induced to osteogenic differentiation by using a hypertrophic media. The hypertrophic induced-ASC spheroids, within two weeks, showed high mRNA expression of genes related to hypertrophy. When submitted to the *in vitro* fusion process, the hypertrophic induced spheroids showed a progressive increase in extracellular calcium deposits and high positivity for collagen I and osteocalcin. In addition, the fused hypertrophic induced ASC spheroids showed the formation of crystal-like structures in their interior. Then, non-induced and induced ASC spheroids were seeded on the surface of PLA/CHA scaffolds *in vitro* and next implanted in critical-size rat calvaria bone defect model and the formation of new bone tissue in the central region of the defect was observed. The aim of part B was to develop a functional *in vitro* construct containing a vascular part, as a pre-vascularization approach for bone engineering. Initially, the bmMSCs spheroids were induced using a hypertrophic media. Then, the fabrication of co-culture vascular spheroids was performed, from different ratios of HUVECs:bmMSCs. Next, the hypertrophic induced spheroids and co-cultured vascular spheroids were then seeded in a 3D printed bioactive polycaprolactone (PCL) scaffold. The constructs were kept in a dynamic bioreactor system and showed high fusion capacity, density and production of extracellular matrix of functional cartilage. Afterwards, the constructs were implanted in subcutaneous defect in mice and, based on the macroscopic analyses, the formation of new tissue was observed. Finally, the co-culture vascular spheroids were bioprinted using the extrusion technique and did not show any damage in their diameter, morphology and cell viability. In conclusion, all Tissue Engineering approaches developed in this thesis were carried out for the biofabrication of bone tissue and have potential for translation in the future. In addition, these approaches can converge to the 3D bioprinting strategy, considered innovative in national and international territory.

Key-words: bone tissue, mesenchymal stem/stromal cells, spheroids, fusion, osteogenesis, 3D scaffold, vascularization, 3D bioprinting, bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão esquemática dos processos de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral.....	38
Figura 2: Regulação da diferenciação dos condrócitos pelo RUNX-2.....	40
Figura 3: Formação de vasos sanguíneos <i>in vivo</i> a partir dos processos de vasculogênese e angiogênese.....	41
Figura 4: Processo de angiogênese durante a ossificação endocondral.....	44
Figura 5: Processo de angiogênese durante a ossificação intramembranosa...	45
Figura 6: Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica por uma abordagem de indução em duas etapas.....	51
Figura 7: Tipos de bioimpressão 3D.....	54
Figura 8: Esferoides como blocos de construção para abordagens de bioimpressão 3D.....	56
Figura 9: Estratégia de simulação computacional considerando os esferoides como blocos de construção em uma biotinta de sacrifício com células endoteliais.....	57
Figura 10: Linha do tempo do número de estudos realizados utilizando esferoides em abordagens de bioimpressão 3D.....	58
Figura 11: Abordagem livre de arcabouços a partir da extrusão de cilindros contendo componentes celulares de vasos sanguíneos e esferoides.....	59
Figura 12: Estratégia de biofabricação utilizando esferoides a partir do método de Kenzan.....	60
Figura 13: Etapas do método de biofabricação por bioimpressão assistida com esferoides.....	61
Figura 14: Estratégia de biofabricação livre de arcabouço a partir do método FRESH utilizando esferoides.....	62
Figura 15: Estratégia a partir de construídos bioimpressos suporta o processo de ossificação endocondral <i>in vivo</i>	63
Figura 16: Estratégia para biofabricação de um construído ósseo com a porção vascular a partir da bioimpressão 3D por extrusão.....	64
Figura 17: Construído bioimpresso com maior tamanho de poro desenvolve uma melhor resposta para formação de tecido ósseo <i>in vivo</i>	65

Figura 18: Biofabricação de uma rede funcional de osteócitos a partir da técnica de bioimpressão 3D.....	66
Figura 19: Representação esquemática de diferentes abordagens em engenharia de tecidos.....	67
Figura 20: Estratégias em Engenharia de Tecidos para estimular o processo de angiogênese.....	68
Figura 21: Esferoides vasculares como unidades de pré-vascularização e como blocos de construção para abordagens em Engenharia de Tecidos.....	73
Figura 22: Hierarquia por tamanho dos vasos sanguíneos (das artérias às veias) de acordo com as técnicas de biofabricação atuais.....	74
Figura 23: Exemplo de abordagem para biofabricação de uma rede vascular a partir da técnica de bioimpressão 3D por extrusão.....	75
Figura 24: Exemplo de estratégia de bioimpressão 3D sequencial para criação de canais vasculares a partir de uma biotinta de sacrifício e de hidrogéis fotocuráveis.....	76
Figura 25: Representação esquemática de como os esferoides vasculares podem ser utilizados na engenharia de tecido ósseo.....	79
Figura 26: Molde de silicone MicroTissues® 3D Dish® (Sigma).....	86
Figura 27: Implante dos grupos de arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com e sem esferoides de ASCs controles ou induzidos em modelo de defeito ósseo crítico em calvária de ratos <i>Wistar</i>	100
Figura 28: Etapas de preparo da agarose micromoldada em 3D Petri Dish®.....	103
Figura 29: Etapas de produção dos esferoides em hidrogel de agarose micromoldado.....	104
Figura 30: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os diâmetros dos esferoides controles e induzidos ao longo de cinco semanas de cultivo.....	105
Figura 31: Expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica por Q-PCR em esferoides controles e induzidos em duas, três e cinco semanas.....	106
Figura 32: Ausência de cristalização em esferoides induzidos para a via osteogênica.....	108

Figura 33: Esferoides induzidos para a via osteogênica apresentaram uma elevada secreção de diferentes mediadores relacionados à osteogênese em duas semanas de cultivo.....	110
Figura 34: Alta resistência mecânica dos esferoides induzidos para a via osteogênica.....	111
Figura 35: Os esferoides induzidos mudaram de comportamento plástico para viscoelástico durante os ciclos de compressão.....	112
Figura 36: Processo de fusão <i>in vitro</i> dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após duas semanas de indução osteogênica dos esferoides.....	114
Figura 37: Processo de fusão <i>in vitro</i> dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após três semanas de indução osteogênica dos esferoides.....	115
Figura 38: Processo de fusão <i>in vitro</i> dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após cinco semanas de indução osteogênica dos esferoides.....	115
Figura 39: Viabilidade celular por kit comercial de fluorescência LIVE/DEAD® nos quartetos de esferoides não induzidos após 7 dias do processo de fusão.....	116
Figura 40: Os dupletos de esferoides controles e induzidos apresentam baixa diferença no processo de fusão.....	117
Figura 41: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão.....	119
Figura 42: Coloração de Alizarina vermelha dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão.....	121
Figura 43: Composição de colágeno do tipo I, N-caderina e osteocalcina em quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão.....	122
Figura 44: Processo de fusão <i>in vitro</i> em meio indutor dos quartetos de esferoides induzidos após duas e três semanas de indução osteogênica dos esferoides.....	124
Figura 45: Os dupletos de esferoides induzidos cultivados por duas e três semanas apresentam diferença no processo de fusão em meio indutor.....	126

Figura 46: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor.....	127
Figura 47: Coloração de Alizarina vermelha dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor.....	128
Figura 48: Composição de colágeno I, colágeno do tipo X, N-caderina e osteocalcina em quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor.....	130
Figura 49: Presença de cristalização em quartetos de esferoides induzidos fusionados no ponto de três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor.....	131
Figura 50: Micrografias eletrônicas de varredura de esferóides semeados em arcabouço de PLA após uma semana de cultura.....	133
Figura 51: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA após semeadura dos esferoides controles de ASCs.....	134
Figura 52: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com esferoides interagindo em sua superfície.....	135
Figura 53: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma elevada interação dos esferoides na superfície e eventos de migração celular.....	137
Figura 54: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma baixa interação dos esferoides induzidos por 2 semanas em meio condrogênico na superfície.....	138
Figura 55: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma alta interação dos esferoides induzidos por 2 dias em meio condrogênico na superfície.....	139
Figura 56: Esferoides não induzidos e induzidos para a via hipertrófica em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentaram uma elevada secreção de mediadores relacionados à angiogênese e osteogênese.....	141
Figura 57: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao ensaio <i>in</i>	

vivo em defeito ósseo crítico de calvária em ratos <i>Wistar</i> após o período de 1 mês.....	143
Figura 58: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao <i>ensaio in vivo</i> em defeito ósseo crítico de calvária em ratos <i>Wistar</i> após o período de 3 meses.....	144
Figura 59: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao <i>ensaio in vivo</i> em defeito ósseo crítico de calvária em ratos <i>Wistar</i> após o período de 6 meses.....	145
Figura 60: Quantificação de osso neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo nos grupos implantados em defeito ósseo crítico de calvária em ratos após 1, 3 e 6 meses.....	146
Figura 61: Etapas da fabricação dos micropoços de agarose.....	149
Figura 62: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de bmMSC induzidos ao longo de 28 dias de cultivo.....	159
Figura 63: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha e quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides de bmMSC induzidos após 21 dias de cultivo.....	161
Figura 64: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 28 dias de cultivo.....	162
Figura 65: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de bmMSC induzidos contendo 4.000 células/cada ao longo de 2 semanas de cultivo.....	163
Figura 66: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 2 dias de cultivo.....	165
Figura 67: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 2 semanas de cultivo.....	166

Figura 68: Micrografias de contraste de fase após 24h e 48h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 7 dias em meio de indução condrogênico.....	167
Figura 69: Micrografias de fluorescência após 48h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 7 dias em meio de indução condrogênico.....	168
Figura 70: Micrografias de fluorescência após 48h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 2 dias em meio de indução condrogênico.....	169
Figura 71: Fabricação de esferoides de co-cultura entre human bmMSCs/HUVECs.....	170
Figura 72: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de co-cultura de human bmMSC e HUVECs de acordo com diferentes proporções de células.....	171
Figura 73: Comportamento funcional dos esferoides vasculares em biotinta de fibrina após 3 e 7 dias em cultivo.....	172
Figura 74: Micrografias de contraste de fase dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina.....	174
Figura 75: Micrografias de fluorescência dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina.....	175
Figura 76: Análise morfológica dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina.....	177
Figura 77: Micrografias de fluorescência dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina após 3 dias de cultivo.....	178
Figura 78: Bioimpressão dos esferoides vasculares em biotinta de fibrina.....	178
Figura 79: Imagens representativas dos arcabouços impressos 3D de PCL.....	181
Figura 80: Semeadura dos esferoides hipertróficos e vasculares no arcabouço 3D impresso de PCL.....	183

Figura 81: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos construídos induzidos em meio condrogênico após 2 semanas de cultivo.....	185
Figura 82: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos construídos induzidos em meio hipertrófico após 1 semana de cultivo.....	186
Figura 83: Micrografias de fluorescência dos construídos com o canal não preenchidos mantidos em meio indutor condrogênico por 2 semanas e meio indutor hipertrófico por 1 semana de cultivo.....	187
Figura 84: Imagens macroscópicas dos grupos experimentais após o período de implante em defeito subcutâneo em camundongos.....	188
Figura 85: Estratégias em Engenharia de Tecidos para promover a biofabricação de tecido ósseo.....	227
Figura 86: Bioimpressão 3D de tecido ósseo a partir de esferoides celulares como blocos de construção, biomateriais bioativos e biotintas.....	231

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes do meio de cultivo com suas respectivas concentrações.....	87
Tabela 2: Anticorpos com as espécies de obtenção e suas respectivas diluições de uso para o ensaio de imuno-histoquímica.....	96
Tabela 3: Grupos, períodos experimentais e total de animais utilizados no ensaio <i>in vivo</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS

- α SMA** – (*smooth muscle α -actin*; alfa actina de músculo liso)
- μ CT** – (*micro computed tomography*; micro tomografia computadorizada)
- 2D** – (bidimensional)
- 3D** – (tridimensional)
- AB** – (*alcian blue*; azul de alcian)
- ALP** – (*alkaline phosphatase*, fosfatase alcalina)
- ASCs** – (*adipose derived stem/stromal cells*, células-tronco/estromais derivadas de tecido adiposo)
- bmMSCs** – (*bone marrow mesenchymal stem/stromal cells*, células-tronco/estromais mesenquimais isoladas da medula óssea)
- CD** – (*cluster of differentiation*, cluster de diferenciação)
- COL** – (colágeno)
- DMEM** – (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose and high glucose*, meio de eagle modificado por dulbecco-baixa glicose e por alta glicose)
- DMSO** – (dimetilsulfóxido)
- DNA** – (ácido desoxirribonucleico)
- EDTA** – (*ethylenediamine tetraacetic acid*, ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EDX** – (*Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*, Espectroscopia de raios X por dispersão em energia)
- EGM** – (*endothelial growth medium*; meio de crescimento endotelial)
- FDM** – (*fused deposition modelling*; modelagem de deposição fundida)
- FGF** – (*fibroblast growth factor*, fator de crescimento de fibroblasto)
- GFP** – (*green fluorscence protein*, proteína fluorescente verde)
- GM-CSF** – (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos)
- HA** - (hidroxiapatita)
- HE** – (hematoxilina e eosina)
- HIF** – (*hypoxia-induced factor*; fator de indução de hipóxia)
- HUVECs** – (*human umbilical vein endothelial cells*; células endoteliais da veia umbilical humana)
- IFN** – (interferon)
- IL** – (interleucina)

ISCT – (*International Society for Cellular Therapy*, Sociedade Internacional para Terapia Celular)

ITS – (insulina, transferrina e selênio)

MCP – (*macrophage chemotactic factor*, fator quimiotático de macrófagos)

MEC – (matriz extracelular)

MEV – (microscopia eletrônica de varredura)

MET – (microscopia eletrônica de transmissão)

MMP – (metaloproteinase)

MSCs – (*mesenchymal stem/stromal cells*, células-tronco/estromais mesenquimais)

nHA – (*nano hydroxiapatite*, nano hidroxiapatita)

PBS – (*phosphate buffered saline*, salina de fosfato tamponada)

PCL – (*polycaprolactone*, policaprolactona)

PDGF – (*platelet derived growth factor*, fator de crescimento derivado de plaquetas)

PDGFR - (*platelet derived growth factor receptor*, receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas)

PLA – (*polylactic acid*, poli (ácido lático))

PLA/CHA – (*nanostructured carbonated hydroxyapatite*, poli (ácido lático) /carbonato apatita)

POC – (*primary ossification center*, centro primário de ossificação)

PS – (*penicilin and streptomycin*, penicilina e streptomicina)

RNA – (*ribonucleic acid*, ácido ribonucleico)

Q-PCR – (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa)

Runx2 – (*runt-related transcription factor 2*)

SFB – (soro fetal bovino)

sGAG – (*sulfated glycosaminoglycans*, glicosaminoglicanos sulfatados)

Sox – (*sex determining region Y-box*)

STEM – (*scanning transmission electron microscopy*, microscopia eletrônica de transmissão por varredura)

TEM – (*transmission electron microscopy*, microscopia eletrônica de transmissão)

TGF- β – (*transforming growth factor* beta; fator transformador de crescimento beta)

TSP1 – (*Thrombospondin-1*, trombospondina-1)

UV – (ultravioleta)

VEGF – (*vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular)

VEGFR – (*vascular endothelial growth factor receptor*; receptor de fator de crescimento endotelial vascular)

Wnt – (*Wingless-type MMTV integration site family*)/ β -catenina)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO: CONTEXTUALIZAÇÃO	32
1.1..... CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA (bmMSCs)	35
1.2 CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO (ASCs)	36
1.3 O TECIDO ÓSSEO E O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	37
1.3.1 Os processos de vasculogênese, angiogênese e remodelamento	41
1.3.2 O processo de vascularização na formação do tecido ósseo	43
1.4 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA	47
1.4.1 Abordagens baseadas em arcabouços (<i>scaffold-based</i>)	47
1.4.2 Abordagens livres de arcabouço (<i>scaffold-free</i>)	49
1.5 ESTRATÉGIAS DE BIOFABRICAÇÃO NO CONTEXTO DA MEDICINA REGENERATIVA A PARTIR DA BIOIMPRESSÃO 3D	53
1.5.1 A técnica de bioimpressão 3D na área de medicina regenerativa	53
1.5.2 O uso de esferoides como blocos de construção em técnicas de bioimpressão 3D	55
1.6 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA A BIOFABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO	62
1.7 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA INDUÇÃO DO PROCESSO DE VASCULARIZAÇÃO	67
1.7.1 Fatores de crescimento	68
1.7.2 Desenvolvimento de arcabouços biomiméticos e a influência de suas topografias	70
1.7.3 Estratégias de pré-vascularização de construídos em Engenharia de Tecidos	71
1.7.4 Estratégias em biofabricação para vascularização	73
1.8 ESTRATÉGIAS DE VASCULARIZAÇÃO PARA A ENGENHARIA ÓSSEA	76
2. JUSTIFICATIVA	80
3. OBJETIVOS	82

3.1 GERAL.....	106
3.2 ESPECÍFICOS: PARTE A.....	82
3.3 ESPECÍFICOS: PARTE B.....	84
4. MATERIAL E MÉTODOS: PARTE A	85
4.1 EXPANSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO EM SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL	85
4.2 FABRICAÇÃO DO HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO	85
4.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE ASCs EM HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO E INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA	86
4.4 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	87
4.5 COLETA DE SOBRENADANTE E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES SECRETADOS POR <i>MULTIPLEX</i>	88
4.6 ENSAIOS DE BIOMECÂNICA PARA OBTENÇÃO DE MÓDULO DE <i>YOUNG</i> E TENSÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	89
4.7 EXTRAÇÃO DOS mRNAs E ANÁLISE POR Q-PCR DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	90
4.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS ESFEROIDES INDUZIDOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E ELEMENTAR POR MICROANÁLISE DE RAIO-X (EDX)	91
4.9 ANÁLISE E CINÉTICA DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	92
4.10 ANÁLISE DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES FUSIONADOS.....	92
4.11 MEDIÇÃO DE ÂNGULOS DOS ESFEROIDES DURANTE O PROCESSO DE FUSÃO	93
4.12 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESFEROIDES FUSIONADOS: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E EMBLOCAMENTO.....	93
4.13 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA	94
4.14 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM ALIZARINA VERMELHA	94
4.15 ANÁLISES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ESFEROIDES FUSIONADOS	95
4.16 FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS DE PLA/CHA POR MANUFATURA ADITIVA.....	96
4.17 SEMEADURA DOS ESFEROIDES DE ASCs NO ARCABOUÇO 3D IMPRESSO DE PLA/CHA.....	97
4.18 ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	98

4.19 GRUPOS EXPERIMENTAIS DE ENSAIO DE DEFEITO CRÍTICO EM CRÂNIO DE RATOS WISTAR (<i>Rattus norvegicus</i>)	99
4.20 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO	101
4.21 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA	101
4.22 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	102
4.23 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	102
5. RESULTADOS: PARTE A	103
5.1 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	103
5.2 CARACTERIZAÇÃO DE HOMOGENEIDADE DE TAMANHO E FORMA DOS ESFEROIDES DE ASCs NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA.....	104
5.2.1 Esferoides de ASCs induzidos apresentam maior diâmetro e homogeneidade de tamanho do que esferoides da condição não induzida.	104
5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs.....	105
5.3.1 Expressão de genes relacionados à eventos de hipertrofia em esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica	105
5.3.2 Os esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica apresentam diferenças na ultraestrutura celular ao longo do período de cultivo e ausência de cristalização na matriz extracelular	107
5.3.3 Elevada secreção de mediadores solúveis por esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica	109
5.3.4 Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica apresentam uma elevada resistência mecânica à compressão	110
5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCS NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO NÃO INDUTOR.....	113
5.4.1 Os esferoides induzidos apresentam uma cinética de fusão diferente dos esferoides não induzidos ao longo das semanas de cultivo	113
5.4.2 Os esferoides fusionados apresentam uma alta viabilidade celular	116
5.4.3 Os dupletos de esferoides não induzidos e induzidos submetidos ao processo de fusão apresentam um comportamento de aproximação similar ao longo do período de fusão	116
5.4.4 Os quartetos de esferoides induzidos apresentam diferenças morfológicas ao final do processo de fusão	118

5.5 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS.....	120
5.5.1 Os esferoides induzidos apresentam maior marcação de depósitos de cálcio com a progressão do processo de fusão	120
5.5.2 Análise de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos fusionados	121
5.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO INDUTOR.....	123
5.6.1 Os esferoides induzidos em diferentes períodos de cultivo apresentam uma cinética de fusão similar em meio indutor osteogênico.....	123
5.6.2 Os dupletos de esferoides induzidos submetidos ao processo de fusão durante a indução não apresentam o mesmo comportamento de aproximação.....	124
5.6.3 Os quartetos de esferoides induzidos apresentam diferenças morfológicas ao final do processo de fusão	126
5.7 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO INDUTOR.....	128
5.7.1 Os esferoides apresentam similar marcação de depósitos de cálcio durante a fusão em meio indutor	128
5.7.2 Análise de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos fusionados em meio indutor	129
5.7.3 Os esferoides apresentam diferenças no conteúdo elementar durante a fusão em meio indutor	130
5.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCs NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS SEMEADOS NOS ARCABOUÇOS 3D IMPRESSOS DE PLA e PLA/CHA.....	132
5.8.1 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado apresentam adesão à superfície do biomaterial	132
5.8.2 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 500 µm, menor número de camadas e aberto, apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial.....	133
5.8.3 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, menor número	

de camadas e aberto, apresentam mudanças morfológicas e interação com o biomaterial	134
5.8.4 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado, apresentam mudança de morfologia, elevada interação com a superfície do biomaterial e alta migração celular...	136
5.8.5 Esferoides de ASCs induzidos por 2 semanas semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial	137
5.8.6 Esferoides de ASCs induzidos por 2 dias semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial	138
5.8.7 Esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentam alta secreção de mediadores solúveis relacionados a angiogênese e osteogênese	139
5.9 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO DE CALVÁRIA EM RATOS <i>Wistar</i>	142
5.10 OS CONSTRUÍDOS CONTENDO ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS A HIPERTROFIA APRESENTARAM MAIOR QUANTIDADE DE OSSO NEOFORMADO APÓS IMPLANTE	145
6. MATERIAL E MÉTODOS: PARTE B	147
6.1 EXPANSÃO EM CULTIVO DE MONOCAMADA DAS <i>BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS</i> (bmMSCs, <i>DO INGLÊS</i> , CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA)	147
6.2 EXPANSÃO EM CULTIVO DE MONOCAMADA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS	147
6.3 PREPARO DA BIOTINTA DE FIBRINA	148
6.4 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E VASCULARES	148
6.4.1 Fabricação dos micropoços de agarose	148
6.4.2 Semeadura de células nos micropoços.....	150
6.4.2.1 Fabricação dos esferoides hipertróficos	150
6.4.2.2 Fabricação dos esferoides vasculares	151
6.5 ENSAIO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES INDUZIDOS PARA A VIA CONDROGÊNICA	151

6.6 SEMEADURA DOS ESFEROIDES VASCULARES NA PROPORÇÃO DE 3MSC:1HUVEC EM DIFERENTES DENSIDADES NA BIOTINTA DE FIBRINA.....	152
6.7 BIOIMPRESSÃO DOS ESFEROIDES VASCULARES EM BIOTINTA DE FIBRINA.....	152
6.8 PREPARO DOS ARCABOUÇOS DE PCL POR MANUFATURA ADITIVA	153
6.9 PROCESSO DE REVESTIMENTO DE NANO HIDROXIAPATITA (nHA) NOS ARCABOUÇOS DE PCL	153
6.10 SEMEADURA DOS ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E VASCULARES EM ARCABOUÇO DE PCL 3D IMPRESSO	154
6.11 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES	155
6.12 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR KIT COMERCIAL DE FLUORESCÊNCIA <i>LIVE/DEAD®</i>	155
6.13 ANÁLISES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	155
6.14 ANÁLISE BIOQUÍMICA QUANTITATIVA	156
6.15 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	157
6.16 IMPLANTE SUBCUTÂNEO EM CAMUNDONGOS	157
7. RESULTADOS: PARTE B.....	159
7.1 OS ESFEROIDES DE bmMSC CONTENDO 2.000 CÉLULAS/CADA APRESENTAM REDUÇÃO EM SEU VALOR DE DIÂMETRO E ESFERICIDADE AO LONGO DO PERÍODO DE CULTIVO	159
7.1.1 Caracterização histológica dos esferoides de bmMSC contendo 2.000 células/cada	160
7.2 OS ESFEROIDES DE bmMSC CONTENDO 4.000 CÉLULAS/CADA APRESENTAM AUMENTO EM SEU VALOR DE DIÂMETRO E MANUTENÇÃO DA ESFERICIDADE AO LONGO DO PERÍODO DE CULTIVO	162
7.2.1 Caracterização histológica dos esferoides de bmMSC contendo 4.000 células/cada	164
7.3 OS ESFEROIDES DE bmMSC APRESENTAM RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE FUSÃO EM MEIO DE INDUÇÃO CONDRÓGENICO.....	166
7.4 OS ESFEROIDES DE BMMSC SE FUSIONAM APÓS 48H DE CULTIVO PREVIAMENTE REALIZADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONDRÓGENICO	168
7.5 ESFEROIDES DE CO-CULTURA ENTRE bmMSCS/HUVECS APRESENTAM DIFERENÇAS DE MORFOLOGIA, DIÂMETRO E	

ESFERICIDADE E NA PRODUÇÃO DE MICROVASOS DE ACORDO COM PROPORÇÃO DE CÉLULAS INVESTIGADA	169
7.6 BIOIMPRESSÃO DOS ESFEROIDES VASCULARES EM BIOTINTA DE FIBRINA.....	178
7.7 ARCABOUÇOS DE PCL APRESENTAM ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL APÓS PROCESSO DE IMPRESSÃO 3D	180
7.8 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS ENGENHEIRADOS A PARTIR DE ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E ESFEROIDES VASCULARES COMO ABORDAGEM PARA ENGENHARIA ÓSSEA	182
7.8.1 Semeadura dos esferoides hipertróficos e vasculares no arcabouço 3D impresso de PCL.....	182
7.8.2 Análise morfológica dos construídos revela alta intensidade de marcação e distribuição de componentes da matriz extracelular cartilaginosa após 2 semanas em meio indutor condrogênico.....	183
7.8.3 Análise morfológica dos construídos revela alta intensidade de marcação e distribuição de componentes da matriz extracelular cartilaginosa e marcação positiva para Alizarina vermelha após 1 semana em meio hipertrófico	184
7.9 IMPLANTE SUBCUTÂNEO DOS CONSTRUÍDOS ENGENHEIRADOS	187
7.9.1 Análise macroscópica das amostras dos construídos pós implante	187
8. DISCUSSÃO	189
8.1 PROPRIEDADES MORFO-FUNCIONAIS DOS ESFEROIDES DE bmMSCs e ASCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA	189
8.1.1 Os esferoides de MSCs adquirem propriedades funcionais <i>in vitro</i> relacionados a via hipertrófica	189
8.1.2 Os esferoides de ASCs não apresentam mineralização na matriz extracelular.....	195
8.2 O PROCESSO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE MSCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA.....	196
8.2.1 Os esferoides de MSCs induzidos para hipertrofia apresentam uma resistência ao processo de fusão	196
8.2.2 O processo de fusão dos esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia parece otimizar a indução osteogênica <i>in vitro</i>	200
8.2.3 A indução da hipertrofia pode influenciar o uso dos esferoides de MSCs como blocos de construção em abordagens de biofabricação	201

8.3 DESENVOLVIMENTO DE CONSTRUÍDOS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DA SEMEADURA DE ESFEROIDES DE MSCs EM ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS 3D IMPRESSOS	202
8.3.1 Os esferoides de MSCs apresentam diferença nos processos de adesão, migração e proliferação celular de acordo com a topografia do arcabouço	202
8.3.2 Os esferoides de MSCs induzidos a hipertrofia apresentam um comportamento distinto após a semeadura no arcabouço	205
8.3.3 Os esferoides de ASCs semeados no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentam elevada secreção de mediadores solúveis....	207
8.3.4 O uso do bioreator pode influenciar positivamente na manutenção do cultivo dos construídos	209
8.4 FABRICAÇÃO DE ESFEROIDES VASCULARES PARA ENGENHARIA ÓSSEA.....	211
8.4.1 O uso da biotinta de fibrina impacta positivamente no cultivo de esferoides vasculares	211
8.4.2 A densidade de esferoides vasculares semeados em biotinta de fibrina influencia suas propriedades funcionais	215
8.5 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS PRÉ-VASCULARIZADOS <i>IN VITRO</i>	217
8.5.1 A pré-vascularização dos construídos com esferoides vasculares não impacta a manutenção do cultivo <i>in vitro</i>.....	217
8.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO	220
8.6.1 Os construídos com esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia formam tecido ósseo novo em modelo de defeito crítico	220
8.7 BIOIMPRESSÃO DE ESFEROIDES.....	223
8.7.1 O processo de extrusão de esferoides vasculares em biotinta de fibrina não compromete sua morfologia e viabilidade	223
8.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	226
9. CONCLUSÕES	232
9.1 PROPRIEDADES MORFOFUNCIONAIS DOS ESFEROIDES DE bmMSCS E ASCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA	232
9.2 O PROCESSO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE MSCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA.....	232

9.3 DESENVOLVIMENTO DE CONSTRUÍDOS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DA SEMEADURA DE ESFEROIDES DE MSCS EM ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS 3D IMPRESSOS	233
9.4 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS PRÉ-VASCULARIZADOS <i>IN VITRO</i>	233
9.5 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO	234
9.6 BIOIMPRESSÃO DE ESFEROIDES VASCULARES.....	234
9.7 CONCLUSÃO FINAL	234
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	235
ANEXOS	262

1. INTRODUÇÃO: CONTEXTUALIZAÇÃO

A maioria das descobertas para a compreensão da formação de órgãos e tecidos ocorreram a partir do cultivo de células de mamíferos utilizando metodologias de cultivo bidimensionais (2D). Entretanto, como o organismo é um sistema tridimensional (3D) complexo, as técnicas de cultivo 2D de células não são capazes de mimetizar corretamente os sinais mecânicos e bioquímicos que ocorrem *in vivo* (ACHILLI *et al.*, 2012). Em cultivos 2D, as interações que prevalecem são aquelas entre as células e o plástico de cultura e não as interações entre as células e das células com a matriz extracelular, as quais são essenciais para as funções das células em um tecido (ACHILLI *et al.*, 2012). Na ausência de um arcabouço de fixação, as células irão agregar-se através de moléculas de adesão célula-célula em um processo denominado automontagem. Durante este processo, ocorre a formação de estruturas 3D denominadas esferoides (DUGUAY *et al.*, 2003).

Os esferoides apresentam diferentes características que os tornam interessantes para a área de medicina regenerativa, como uma elevada adesão devido a uma produção acelerada de matriz extracelular - e serem capazes de produzir fatores pró-angiogênicos, como o fator endotelial de crescimento vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*). Eles já foram avaliados com sucesso para promover a regeneração de cartilagem e de tecido cardíaco. Além disso, os esferoides são capazes de se fundir, o que os tornam interessantes para serem utilizados em técnicas de bioimpressão 3D (KELM *et al.*, 2010). Esferoides já foram utilizados como blocos de construção para biofabricação de diferentes tecidos (como nervoso e cardíaco) e é crescente a perspectiva para sua utilização em bioimpressão 3D de tecidos autógenos (ELBERT, 2011; BEACHLEY *et al.*, 2014).

A bioimpressão 3D é uma nova tecnologia de manufatura aditiva utilizada para produzir tecidos engenheirados complexos a partir de componentes modulares ou blocos de construção. Essa tecnologia, considerada inovadora no Brasil e no mundo, apresenta grande potencial para escalonar a produção de tecidos em laboratório. Quando utilizados para bioimpressão 3D, espera-se que os esferoides acelerem a formação tecidual e sua maturação através do mecanismo de fusão (BAPTISTA, KRONEMBERGER *et al.*, 2018).

É possível fabricar esferoides de diferentes tipos celulares, como a partir de células tumorais, células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e células-tronco/estromais derivadas de tecido adiposo humano (ASCs, *do inglês, Adipose Derived Stem/Stromal cells*). Atualmente, a maioria dos estudos realizados para fabricação de modelos teciduais mesodermiais a partir de esferoides, foi realizado com células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea (BAPTISTA, KRONENBERGER *et al.*, 2018; RYU *et al.*, 2019). No entanto, um diferencial em utilizar as células-tronco de tecido adiposo humano é que estas correspondem a uma fonte autóloga e de fácil acesso no momento da coleta do tecido. Além disso, estas células apresentam o potencial para se diferenciarem nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (BAPTISTA *et al.*, 2009), o que torna interessante seu uso em abordagens de Engenharia de Tecidos.

Um dos tecidos que é amplamente estudado na área de engenharia tecidual é o osso. O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, responsável principalmente por promover suporte para os tecidos moles, proteção de órgãos vitais e controlar a homeostase mineral. O tecido ósseo é um tecido altamente vascularizado e o desenvolvimento concomitante do sistema vascular e da matriz extracelular mineralizada requer uma interação sinérgica entre o processo de osteogênese e as células endoteliais (YIN *et al.*, 2019). Os vasos sanguíneos são essenciais para a distribuição de oxigênio, nutrientes e células do sistema imunológico, assim como para a remoção de resíduos. Além deste papel convencional, as células endoteliais que formam a camada mais interna da parede do vaso também possuem importantes capacidades de sinalização e podem controlar o crescimento, homeostase e até mesmo a regeneração do tecido circundante. No sistema esquelético, os vasos sanguíneos regulam o desenvolvimento e a regeneração óssea, assim como o processo de hematopoese, fornecendo nichos vasculares para as células-tronco hematopoiéticas (SIVARAJ E ADAMS, 2016; WATSON E ADAMS, 2018).

Ao contrário dos outros tecidos, o osso é capaz de se remodelar e regenerar efetivamente após lesões não críticas (THIEL *et al.*, 2017). Neste contexto, as abordagens atuais para o reparo do tecido ósseo em Engenharia de Tecidos são direcionadas para defeitos críticos e fraturas não unidas, as quais não são capazes de serem reparadas espontaneamente (HERRMANN,

VERRIER e ALINI, 2015). Além disso, dada a importância da vascularização para a homeostase do microambiente do tecido ósseo, é interessante o desenvolvimento de abordagens em Engenharia de Tecidos que considerem a biofabricação de uma rede vascular associada à construídos ósseos.

O número de casos de lesões ósseas causados por trauma, doenças, senectude ou degeneração aumentam a cada ano, com uma tendência de continuar progredindo com o passar do tempo pelo aumento da expectativa de vida da população. Dessa maneira, há a necessidade de tratamentos efetivos para promover o reparo funcional do tecido ósseo lesionado (HAO *et al.*, 2017). Estudos com o uso de células-tronco mesenquimais em associação com biomateriais como abordagem clássica na engenharia óssea foram desenvolvidos com sucesso (GRAYSON *et al.*, 2015; HAO *et al.*, 2017). Porém, abordagens não clássicas que envolvem o uso de esferoides para fabricação de tecido ósseo ainda são pouco exploradas, assim como a associação de esferoides 3D com biomateriais. As principais vantagens relacionadas a interação de esferoides e biomateriais é devido a uma elevada densidade celular alcançada, excelentes propriedades mecânicas e a capacidade de complexar o construído com biomoléculas ativas (OVSIANIKOV *et al.*, 2018).

1.1 CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA (bmMSCs)

As células tronco/estromais mesenquimais (MSCs, *do inglês, mesenchymal stem cells*) são uma população de células estromais, com natureza similar aos pericitos, presentes na medula óssea e na maioria dos tecidos conjuntivos, como tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), parede do cordão umbilical (ROMANOV *et al.*, 2003), sangue periférico (CHONG *et al.*, 2012), fluido amniótico, placenta (IN 'T ANKER *et al.*, 2003), dentre outros. Essas células são capazes de se diferenciar em tecidos mesodermis, como osso e cartilagem (CHARBORD *et al.*, 2010; POURRAJAB *et al.*, 2013).

Devido à sua potencialidade e excelente capacidade de proliferação *in vitro*, as MSCs humanas são consideradas excelentes candidatas para aplicações em medicina regenerativa e já foram aplicadas com sucesso em testes clínicos para o tratamento de diferentes doenças do sistema locomotor, cardiovasculares e neurológicas (POLIMERY *et al.*, 2016).

As MSCs isoladas da medula óssea (bmMSCs, *do inglês, bone marrow mesenchymal stem cells*) foram caracterizadas pela primeira vez por FRIEDENSTEIN e colaboradores (1970). Nesse estudo, os autores demonstraram que a medula óssea apresentava uma rara população de células aderentes ao plástico (aproximadamente 1 em 10.000 células nucleadas) que eram capazes de formar colônias derivadas de uma única célula. Os clones de células aderentes se expandiram em colônias de formato arredondado compostas por células fibroblastóides, o que levou ao termo unidade formadora de colônias de fibroblastos (CFU-F, *do inglês, colony-forming unit - fibroblasts*) (JONES *et al.*, 2007; CHARBORD *et al.*, 2010).

Após a etapa de proliferação, algumas das colônias foram capazes de se diferenciar em agregados semelhantes a pequenas áreas de osso ou cartilagem (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970, 1976). Essas observações iniciais foram então estendidas por estudos de habilidades proliferativas a partir do cálculo do CFU-F e características fenotípicas a partir de estudos por citometria de fluxo (PROCKOP, 1997; CAPLAN E BRUDER, 2001; JONES *et al.*, 2007). Essas células foram eventualmente definidas como multipotentes e capazes de

se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos (CHARBORD *et al.*, 2010).

Em relação a aplicações na área de Engenharia de Tecidos, as bmMSCs apresentam um grande destaque por já terem sido utilizadas com sucesso para promover a regeneração de tecidos mesodermis como osso (QIN *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2020) e cartilagem (RICHARDSON *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2018). A capacidade destas células de se diferenciarem e realizarem o reparo de tecidos está intimamente relacionada com uma grande variedade de moléculas bioativas (principalmente antiapoptóticas, de indução de proliferação, pró-angiogênicas e imunomodulatórias) secretadas por elas, que podem agir de forma parácrina ou autócrina, provendo assim, um microambiente favorável ao processo de regeneração (POLIMERY *et al.*, 2016). No entanto, o procedimento considerado invasivo e o baixo rendimento da coleta de bmMSCs levaram à investigação de alternativas terapêuticas para o uso de MSCs, que incluem, por exemplo, o uso das ASCs (LUBY *et al.*, 2019).

1.2 CÉLULAS-TRONCO/ESTROMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO (ASCs)

O tecido adiposo subcutâneo é uma das fontes mais utilizadas para o isolamento de MSCs (KIM e PARK, 2017). Quando isoladas deste tecido, são denominadas células-tronco/estromais derivadas de tecido adiposo (ASCs, *Adipose Derived Stem/Stromal Cells*), pois por mais que possam ser consideradas morfológica e fenotipicamente similares às MSCs isoladas da medula óssea, apresentam diferenças que as caracterizam como uma nova população celular, pelo fato de pertencerem a microambientes teciduais e origens distintas (BOURIN *et al.*, 2013 e BAPTISTA *et al.*, 2007). Por serem isoladas do tecido adiposo subcutâneo, o processo se torna minimamente invasivo e a quantidade de células-tronco isoladas a partir da fração estromal é elevada (BAPTISTA *et al.*, 2009).

As ASCs seguem os critérios estipulados pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy*) que as definem como células-tronco mesenquimais, as quais têm como características (1) aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultivo *in vitro*, (2)

potencial de diferenciação nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica, (3) expressão de marcadores de superfície estromais incluindo CD73, CD90 e CD105 (DOMINICI *et al.*, 2006). Quando isoladas, as ASCs apresentam marcadores celulares como CD90, CD105, CD73, CD44, CD166 e CD34 (durante os primeiros ciclos de proliferação), e uma falta da expressão do marcador hematopoiético CD45, sendo, portanto, similares fenotipicamente às MSCs isoladas da medula óssea (BAPTISTA *et al.*, 2009).

Devido ao seu potencial de diferenciação, as ASCs estão sendo aplicadas atualmente em abordagens *in vitro* e *in vivo* da Engenharia de Tecidos, para regeneração dos tecidos ósseo e cartilaginoso. Em relação ao tecido ósseo, estudos de diferenciação *in vitro* a partir de ASCs já foram realizados, porém este processo ainda não foi amplamente explorado a partir deste tipo celular quando comparado com os estudos que utilizaram MSCs derivadas da medula óssea (LINDROOS *et al.*, 2011; CIUFFI *et al.*, 2017).

1.3 O TECIDO ÓSSEO E O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo altamente vascularizado e innervado que forma, juntamente com a cartilagem, o sistema esquelético. Dentre as funções do tecido ósseo no organismo, três apresentam destaque, que são (1) promover suporte mecânico e ser um sítio para associação de músculos, a fim de haver locomoção, (2) proteger órgãos vitais e a medula óssea, uma vez que esta encontra-se alojada no interior de ossos longos e planos e (3) reservar cálcio e fosfato utilizados para a manutenção da homeostase (BARON, 2008). Os dois processos para formação do tecido são a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral (PAIVA e GRANJEIRO, 2014).

O processo de ossificação intramembranosa ocorre a partir da diferenciação de MSCs em osteoblastos. Em resumo, ocorre inicialmente a condensação das MSCs, seguida da diferenciação direta destas células em osteoblastos e, por fim, a maturação óssea com a formação dos osteócitos aprisionados na matriz mineralizada (Fig. 1). No processo de ossificação endocondral (onde ocorre a formação dos ossos longos), ou ossificação indireta

(Fig. 1), as MSCs se condensam e diferenciam inicialmente em condrócitos, formando um molde de matriz cartilaginosa hialina que sequencialmente será substituído por tecido ósseo vascularizado (VALENTI *et al.*, 2016). O molde de cartilagem hialina cresce e as células derivadas a partir da região interna do pericôndrio sofrem diferenciação osteoblástica e secretam matriz óssea mineralizada que forma o colar ósseo, subsequentemente tornando-se osso cortical. Os condrócitos no molde de cartilagem proliferam, maturam e hipertrofiam, secretando colágeno X, fatores pró-angiogênicos e fosfatase alcalina, formando o tecido ósseo mineralizado (MACKIE *et al.*, 2011; THOMPSON *et al.*, 2014).

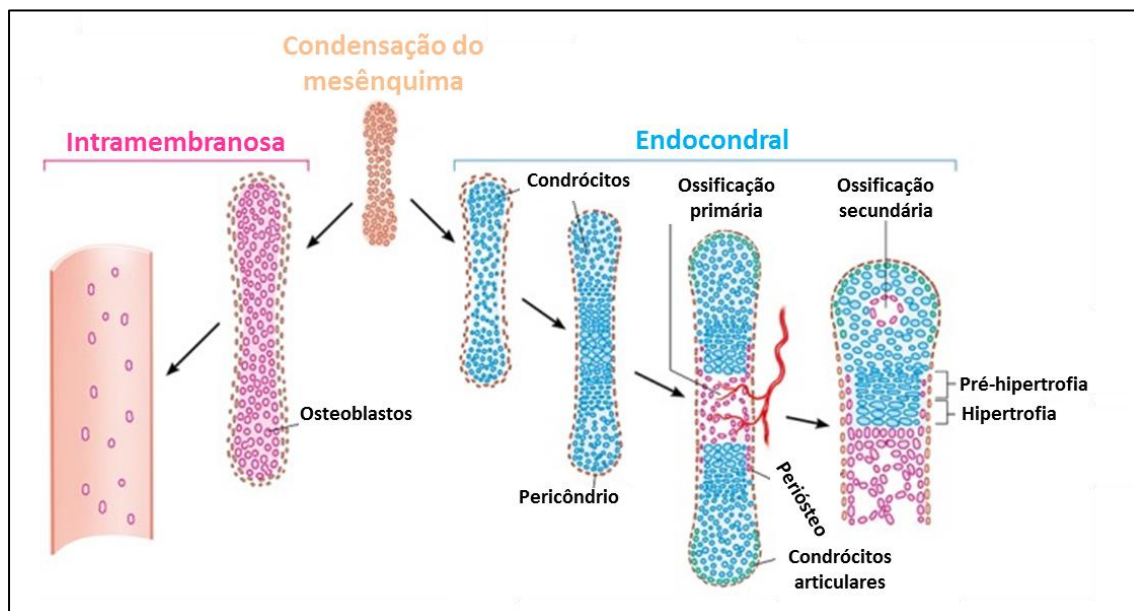


Figura 1: Visão esquemática dos processos de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. Durante o processo de ossificação intramembranosa, as células mesenquimais se diferenciam diretamente em osteoblastos e geram o tecido ósseo. Durante a ossificação endocondral, inicialmente, os condrócitos desenvolvem-se a partir da diferenciação das células-tronco mesenquimais, com a formação de uma cartilagem intermediária. Em seguida, os condrócitos em estágio de hipertrofia, iniciam o processo de mineralização da matriz extracelular, sofrem apoptose e atraem vasos sanguíneos, por onde os osteoblastos irão migrar e iniciar uma placa de crescimento central do tecido ósseo (adaptado de HOUSCHYAR *et al.*, 2019).

Diferentes trabalhos estão explorando a fase de hipertrofia do processo de ossificação endocondral como uma estratégia para engenharia óssea, conhecida como uma estratégia da engenharia de desenvolvimento. O motivo principal é devido a uma otimização do processo de vascularização desencadeado pela expressão de genes de metaloproteinase 13 (MMP-13),

VEGF e fosfatase alcalina (ALP), que estão diretamente relacionados a esta fase da ossificação endocondral (FREEMAN e MCNAMARA, 2016; CRITCHLET et al., 2019).

A osteogênese é um processo estritamente regulado através de populações celulares distintas fenotipicamente, a partir de MSCs para um osteoprogenitor comprometido, osteoblastos maduros e por fim, osteócitos terminalmente diferenciados, aprisionados na matriz extracelular mineralizada. Este programa de desenvolvimento é recapitulado *in vitro* com estágios distintos que incluem a proliferação, formação da matriz extracelular e mineralização, que são baseados em perfis de expressão gênica de cada subpopulação de osteoblastos (MIRON E ZHANG, 2012; LIAM et al., 2006; WU et al., 2017).

É sabido que o RUNX-2 é considerado um dos genes mais importantes para promover a osteogênese (MIRON e ZHANG, 2012). Durante o processo de ossificação endocondral, a hipertrofia dos condrócitos no molde de cartilagem hialina é seguido por invasão de vasos sanguíneos no tecido cartilaginoso. Nos condrócitos hipertróficos, o RUNX-2 já foi relatado por aumentar a atividade do promotor de colágeno X (Fig. 2), regulando sua função durante o processo. Além disso, a invasão de vasos sanguíneos na cartilagem ocorre de forma concomitante com uma *up* regulação de VEGF em condrócitos hipertróficos, que também pode ser coordenado pelo RUNX-2 (BRUDERER et al., 2014).

Durante o processo de diferenciação condrogênica, o RUNX-2 atua desde a fase de imaturação dos condrócitos até os condrócitos hipertróficos terminais e inibe os condrócitos imaturos de adotar o fenótipo de cartilagem permanente. Como dito anteriormente, o RUNX-2 também induz a expressão de colágeno X em condrócitos hipertróficos (Fig. 2) e está envolvido na produção de matriz extracelular destas células (BRUDERER et al., 2014).

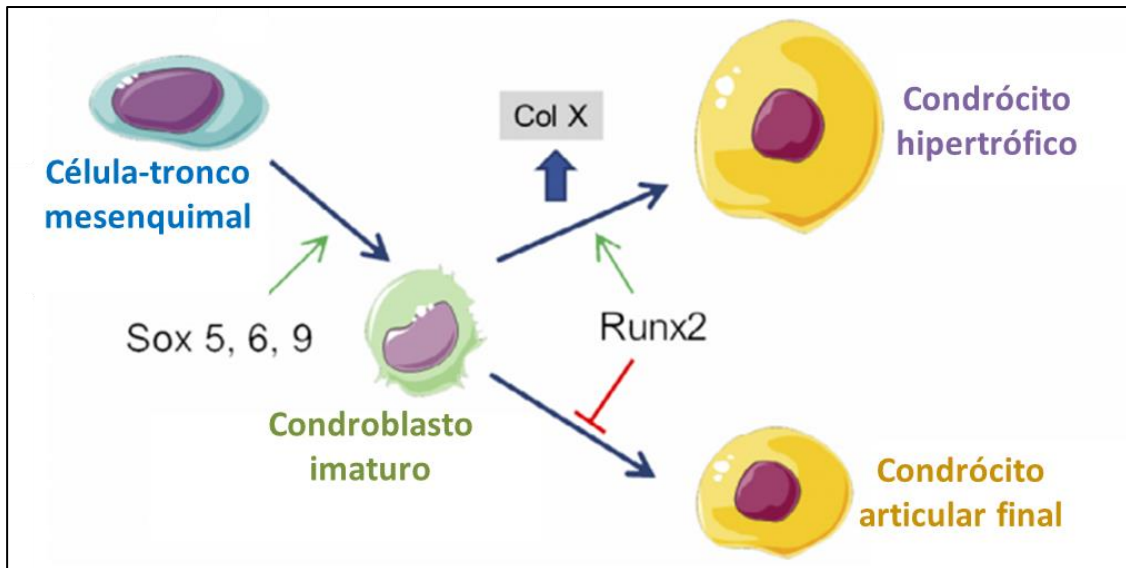


Figura 2: Regulação da diferenciação dos condrocitos pelo RUNX-2. Durante o processo de diferenciação condrogênica, o trio SOX (SOX 5, 6 e 9) atuam positivamente para induzir a diferenciação do condroblasto imaturo. Para promover a ossificação endocondral, o RUNX-2 bloqueia o desenvolvimento do condroblasto e regula positivamente colágeno X, que por sua vez, influencia a formação dos condrocitos hipertróficos que irão dar seguimento na via do processo de ossificação endocondral (adaptado de BRUDERER *et al.*, 2014).

Ao final da osteogênese, o tecido ósseo constitui-se de três tipos celulares principais: os osteócitos, células maduras que se depositam em cavidades ou lacunas no interior da matriz extracelular mineralizada, os osteoblastos, produtores dos constituintes colagenosos e não colagenosos da matriz extracelular e os osteoclastos, células responsáveis pelo remodelamento ósseo (JUNQUEIRA, 2008). A matriz extracelular deste tecido é composta principalmente por fibras de colágeno I associado a cristais de hidroxiapatita que conferem a rigidez e organização do tecido (MURSHED *et al.*, 2018). Outros componentes orgânicos como osteocalcina, osteopontina e biglicana são encontrados na matriz extracelular desse tecido, influenciando a função dos osteoblastos e mecanismos de diferenciação (ALFORD *et al.*, 2015).

Uma problemática relacionada ao tecido ósseo que afeta grande parte da população atual é o número de lesões críticas que não regeneram completamente devido à perda de tecido, fixação inapropriada, infecção ou vascularização inadequada (NG *et al.*, 2016). Dessa maneira, há a necessidade do desenvolvimento de abordagens na área de Engenharia de Tecidos que promovam o remodelamento e a regeneração do tecido ósseo, de modo que ele

volte a ser saudável, funcional e com a vascularização restaurada (ORCIANI *et al.*, 2017).

1.3.1 Os processos de vasculogênese, angiogênese e remodelamento

Existem dois mecanismos distintos para a formação da rede vascular que ocorrem durante o período embrionário, denominados vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese é responsável pela origem do coração e ao primeiro plexo vascular primitivo dentro do embrião e em suas membranas circundantes, como a circulação do saco vitelino. A angiogênese é responsável pela remodelação e expansão dessa rede vascular. Ao passo que a vasculogênese se refere à diferenciação *in situ* e ao crescimento de vasos sanguíneos que são derivados do mesoderma. O processo de angiogênese corresponde a dois mecanismos principais: o brotamento endotelial (ou *sprouting*) e o crescimento microvascular intussusceptivo (Fig. 3) (Patan, 2000).

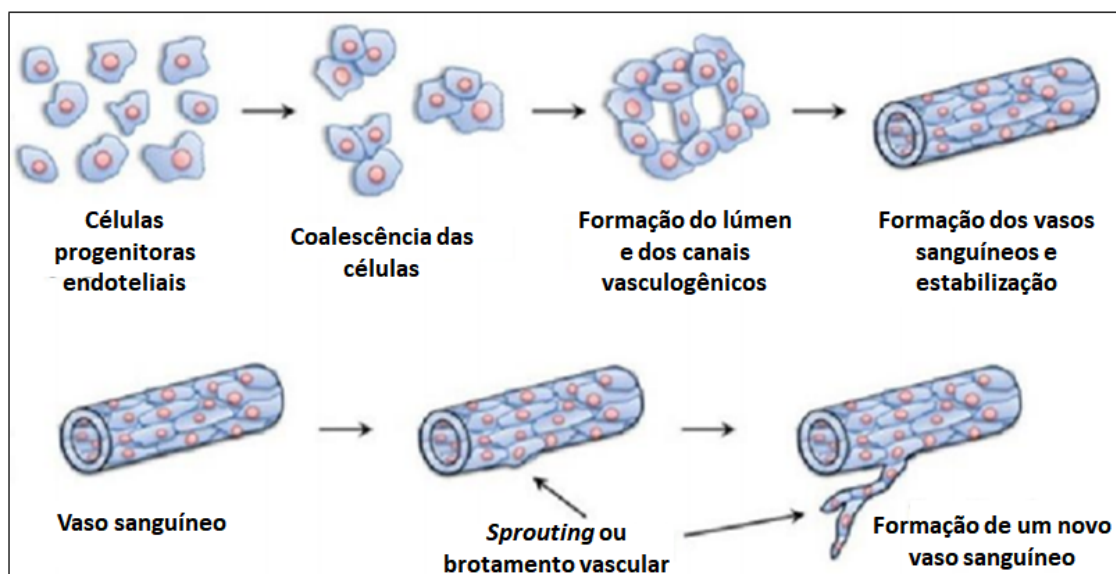


Figura 3: Formação de vasos sanguíneos *in vivo* a partir dos processos de vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese dá origem a rede vascular inicial e promove sua estabilização durante o período de embriogênese, a partir de células progenitoras endoteliais. A angiogênese realiza o remodelamento e desenvolvimento de uma nova rede vascular a partir dos processos de brotamento (*do inglês, sprouting*) ou do crescimento microvascular intussusceptivo (adaptado de JAFARKHANI *et al.*, 2019).

O processo de vasculogênese se inicia por progenitores mesodermiais denominados hemangioblastos que irão dar origem a estruturas denominadas

“ilhas de vasos”. Em seguida, essas células se proliferam e diferenciam para formar precursores das células endoteliais presentes na parede de vasos sanguíneos, os angioblastos, além de precursores das células hematopoiéticas localizadas no lúmen. A fusão das “ilhas de vasos” resulta no primeiro plexo vascular no embrião. Em seguida, no interior do embrião, etapas subsequentes de fusão tecidual e dobramentos irão resultar no desenvolvimento dos vasos sanguíneos no tecido cardíaco, logo no início da embriogênese (PARDANAUD *et al.*, 1989; RISAU *et al.*, 1991; RISAU *et al.*, 1995).

O processo de angiogênese corresponde a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes pelos mecanismos descritos anteriormente. Os órgãos derivados do ectoderma-mesoderma, como cérebro e neuroectoderma, são vascularizados a partir do processo de angiogênese. A angiogênese a partir do brotamento ou *sprouting* de células endoteliais ocorre de acordo com as seguintes etapas: 1) novos capilares originam-se de pequenas vênulas ou de outros capilares; 2) ocorre a degradação local da membrana basal lateral da vênula mais próxima do estímulo angiogênico; 3) em seguida, ocorre a migração de células endoteliais em direção ao estímulo angiogênico; 4) o alinhamento dessas células no modo bipolar; 5) formação de um lúmen; 6) inicia-se a mitose de células endoteliais distantes da ponta principal do broto; 7) formação de laços ou *loops* pela conexão de brotos individuais; 8) início do fluxo sanguíneo; 9) pericitos ou células musculares lisas eventualmente se alinham ao longo das células endoteliais fora do capilar e 10) formação da nova membrana basal (AUSPRUNK *et al.*, 1977; FOLKMAN *et al.*, 1982; FOLKMAN *et al.*, 1985; FOLKMAN *et al.*, 1986).

Além da vasculogênese e angiogênese, o processo de remodelamento é necessário para otimizar a adaptação funcional da rede vascular recém-formada. O remodelamento implica na adição de novos segmentos vasculares, porém também na deleção de segmentos anteriores. Além disso, o processo de remodelamento inclui o crescimento diferencial de segmentos que pode ocorrer por geração de novas células endoteliais na parede dos vasos sanguíneos. Por fim, o remodelamento da rede vascular também pode ocorrer em resposta a condições de fluxo divergentes orquestradas por eventos de sinalização intracelular (PATAN *et al.*, 1997).

A nível molecular, os processos de vasculogênese, angiogênese e remodelamento são principalmente regulados pela família de proteínas do VEGF. Essas proteínas são secretadas pelo mesênquima para formar o plexo de capilares primários a partir da vasculogênese. Dentre as proteínas dessa família, a que mais se destaca é a VEGF-A, a qual foi originalmente identificada como um fator de permeabilidade vascular e apresenta funções chave tanto na vasculogênese, como na angiogênese. A ligação do VEGF com os receptores, principalmente o receptor VEGFR-2 leva a eventos de auto-fosforilação que irão desencadear os estímulos para os processos de migração, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células endoteliais (SENGER *et al.*, 1990; PATEL-HETT *et al.*, 2011).

Dessa forma, os processos de angiogênese e vasculogênese são complexos para promover a formação e expansão de novos vasos sanguíneos. Eles desempenham um papel chave, não apenas no desenvolvimento fisiológico, mas também no crescimento e reparo de tecidos e órgãos (ZUCCHELLI *et al.*, 2019). Portanto, a melhor compreensão dos eventos que desencadeiam esses processos e a fabricação de modelos *in vitro* para mimetizar a produção de microvasos representam estratégias na área de Engenharia de Tecidos, principalmente para a regeneração de tecidos que dependem de vascularização.

1.3.2 O processo de vascularização na formação do tecido ósseo

A vasculatura do tecido ósseo é predominantemente formada a partir do processo de angiogênese. A formação e vascularização óssea ocorrem de forma concomitante por meio das vias de ossificação endocondral e ossificação intramembranosa (WATSON e ADAMS, 2018).

O processo de ossificação endocondral apresenta relação com diferentes etapas do processo de angiogênese (Fig. 4). Primeiro, os condrócitos localizados no local que será o futuro centro de ossificação primário (POC) param de proliferar, tornam-se hipertróficos e secretam fatores pró-angiogênicos para estimular a angiogênese. Em seguida, células osteoprogenitoras no POC também são uma fonte de fatores pró-angiogênicos no microambiente. Os vasos sanguíneos então invadem os condrócitos hipertróficos e formam uma rede vascular inicial que é acompanhada por etapas do processo de osteogênese. A

liberação de sinais devido a maturação e crescimento dos condrócitos hipertróficos nas placas de crescimento, as quais estão presentes nas extremidades do osso longo em desenvolvimento, promove o crescimento dos vasos e ossificação ao longo do eixo longitudinal. Em etapas mais avançadas do processo, os vasos sanguíneos invadem os condrócitos epifisários nas duas extremidades distais do osso longo em crescimento e assim é formado o centro de ossificação secundário (KRONENBERG, 2003).

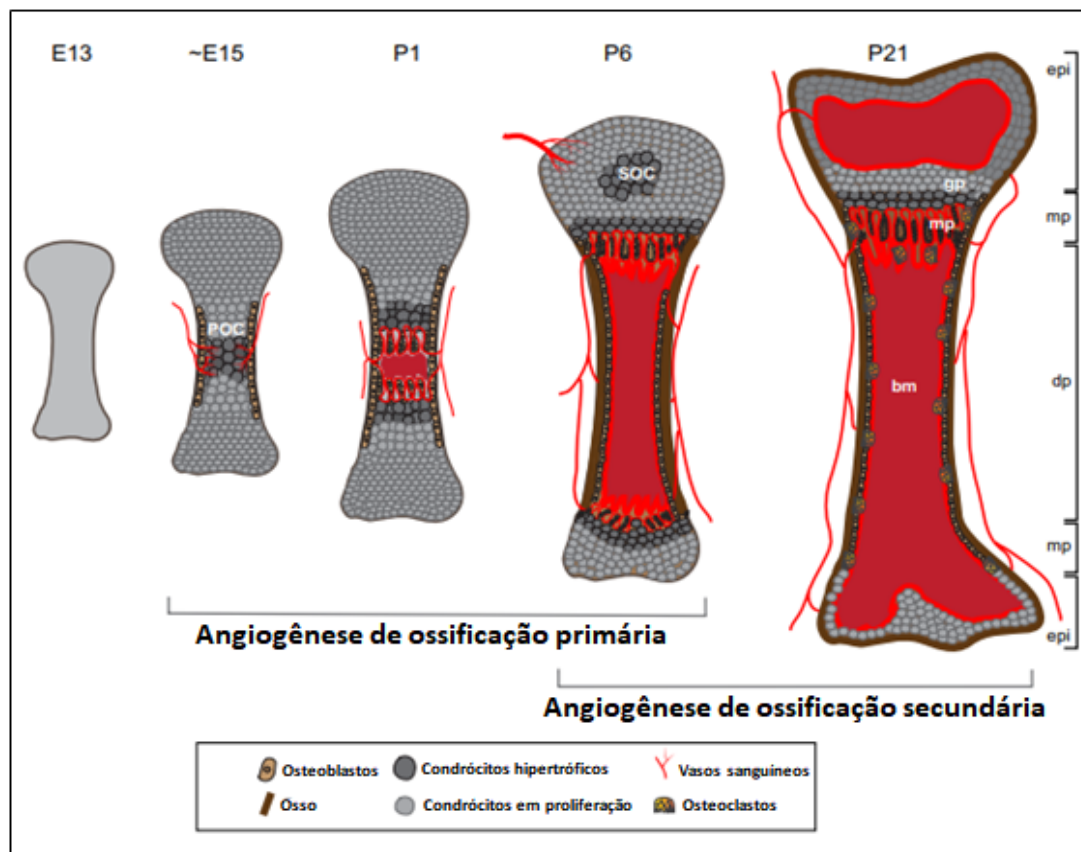


Figura 4: Processo de angiogênese durante a ossificação endocondral. Inicialmente, ocorre a condensação das MSCs e sua diferenciação em condrócitos para formar o molde de cartilagem. Em seguida, condrócitos não proliferativos no centro do POC se tornam hipertróficos e secretam fatores pró-angiogênicos que estimulam a invasão de vasos sanguíneos. Os vasos sanguíneos por sua vez se estendem no osso em crescimento e crescem através da epífise, em ambas as direções. Esses vasos contribuem para a formação do centro de ossificação secundário. Ao final do processo, tanto o crescimento ósseo, como a vascularização avançam e todas as estruturas tornam-se estáveis (adaptado de SIVARAJ *et al.*, 2016).

Como discutido anteriormente, os ossos planos, como os do crânio, são formados pelo processo de ossificação intramembranosa e, portanto, sem um molde intermediário de condrócitos (ABZHANOV *et al.*, 2007). No entanto, assim

como os ossos longos, os ossos planos são altamente vascularizados. O processo de vascularização durante a ossificação intramembranosa é pouco explorado quando comparado ao processo de ossificação endocondral (Fig. 5).

Porém, acredita-se que a nível molecular, ambos os processos ocorrem de forma similar. O que é sabido é que no início do processo, a proximidade aos capilares sanguíneos é necessária, mas não suficiente, para ocorrer a ossificação dentro de um centro de condensação mesenquimal. No caso, são os sinais regulatórios de uma condensação mesenquimal que apresentam um papel chave para promover a angiogênese no centro da condensação e impactar na diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos (SIVARAJ *et al.*, 2016).

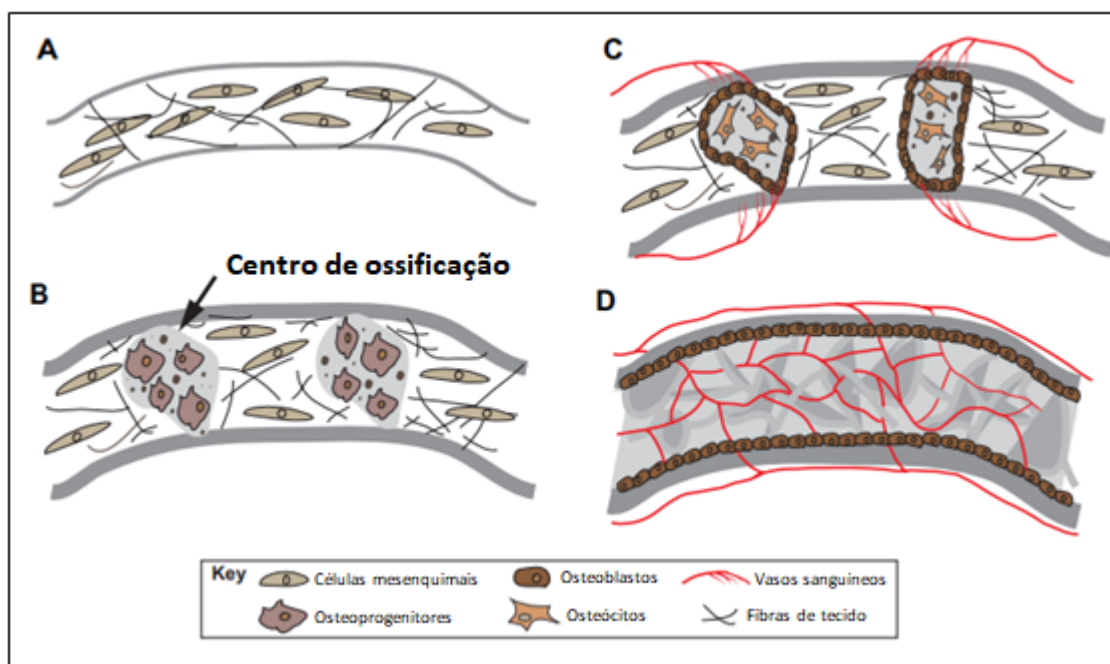


Figura 5: Processo de angiogênese durante a ossificação intramembranosa. (A) inicialmente, as MSCs se condensam e formam estruturas esponjosas. (B) em seguida, essas células se diferenciam em osteoprogenitores e osteoblastos, que secretam matriz extracelular, formam centros de ossificação e tornam-se osteócitos totalmente diferenciados. (C) as proteínas de matriz extracelular e os fatores pró-angiogênicos gerados pelos centros de ossificação atraem vasos sanguíneos. (D) por fim, a subsequente vascularização do osso plano em desenvolvimento promove a conclusão do processo de osteogênese (adaptado de SIVARAJ *et al.*, 2016).

O tecido ósseo é altamente vascularizado e recebe em torno de 10-15% do débito cardíaco em repouso (TOMLINSON e SILVA, 2013). A estrutura e função dos vasos sanguíneos dentro do osso são investigadas há anos e os

primeiros estudos desenvolvidos utilizavam basicamente injeções de corantes e microrradiografias para visualizar os vasos dentro dos ossos. Tais estudos contribuíram expressivamente para a compreensão da organização das estruturas vasculares em ossos tanto de animais como de humanos (TRUETA e MORGAN, 1960; ZAMBONI e PEASE, 1961).

Os ossos longos recebem suprimento sanguíneo de várias fontes, incluindo a artéria nutritiva central, as artérias metafisária-epifisária, as quais adentram nos ossos longos perto de suas extremidades distais, e as artérias periosteais. O sangue flui das artérias através de uma densa rede de capilares e é drenado por uma grande veia central (TRUETA, 1974). Já em ossos planos, a espessura do osso influencia fortemente o padrão da microvasculatura. Regiões mais finas apresentam apenas redes do tipo periosteal e dural, com vasos maiores conectando os dois lados do osso (PANNARALE *et al.*, 1997).

Dentre os fatores de crescimento envolvidos no processo de vascularização no tecido ósseo, destaca-se o VEGF, como descrito anteriormente. O VEGF é um regulador crítico do desenvolvimento vascular, da angiogênese pós-natal e da homeostase, sendo considerado também essencial para o desenvolvimento e reparo do tecido ósseo. Além disso, o VEGF contribui para que os processos de osteogênese e angiogênese ocorram de forma controlada e influencia na diferenciação e funções dos osteoblastos e osteoclastos. Durante os processos de ossificação intramembranosa e endocondral, o VEGF é crítico para que diferentes etapas ocorram com sucesso (HU e OLSEN, 2017).

Portanto, a partir da melhor compreensão da estrutura vascular no tecido ósseo e da sua influência no processo de osteogênese, diferentes estudos começaram a explorar estratégias em Engenharia de Tecidos para complexar construídos, a fim de considerar também a porção vascular. A maioria dos estudos apresentou como principal objetivo final comparar *in vitro* ou *in vivo* a influência da vasculatura no processo de diferenciação osteogênica ou de regeneração óssea. Dessa forma, algumas abordagens principais nesse contexto serão discutidas nos tópicos a seguir.

1.4 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA

1.4.1 Abordagens baseadas em arcabouços (*scaffold-based*)

Os métodos clássicos da Engenharia de Tecidos utilizam a abordagem na qual as células são semeadas em um arcabouço que apresenta propriedades biocompatíveis e biodegradáveis que permitem que elas proliferem e produzam sua própria matriz extracelular com propriedades físicas e químicas semelhantes ao tecido a ser formado (LU *et al.*, 2015). A combinação de células-tronco com biomateriais está sendo considerada atualmente para melhorar a retenção e enxertia destas células após o transplante.

Ao utilizar um biomaterial para regeneração, o esperado é que ele mimetize as propriedades físicas e químicas da matriz extracelular do tecido de interesse, seja biocompatível com o hospedeiro e que otimize o processo de regeneração *in vivo* (sendo necessário suportar a adesão, proliferação e diferenciação celular). Para tal, os biomateriais precisam apresentar excelentes propriedades mecânicas (valores de módulo de *Young*), especificamente entre 0,5-3GPa para o tecido ósseo (PRZEKORA, 2019).

Diferentes biomateriais estão sendo utilizados para a engenharia óssea, incluindo metais, cerâmicas, compósitos e polímeros naturais, cada um apresentando vantagens e desvantagens. Materiais metálicos, como por exemplo titânio, podem ser utilizados por serem biocompatíveis, resistentes e econômicos. Entretanto, estes não são biodegradáveis e podem induzir estresse nos tecidos. Por outro lado, materiais cerâmicos como hidroxiapatita, estão sendo amplamente utilizados devido à sua bioatividade, que está relacionada com a similaridade estrutural e de composição com a fase mineral do tecido ósseo. Além disso, tais propriedades permitem uma melhor adesão celular e síntese de matriz extracelular óssea. Os polímeros são biocompatíveis e versáteis, sendo divididos em sintéticos e naturais (NGUYEN *et al.*, 2012). Uma estratégia interessante para a engenharia óssea corresponde em combinar materiais cerâmicos com polímeros, formando compósitos – principalmente porosos, a fim de promover uma maior bioatividade ao arcabouço (DOMINGOS *et al.*, 2017). Atualmente, diferentes tipos de “biomateriais inteligentes” (*smart*

materials”) estão sendo produzidos por técnicas refinadas, como a impressão 3D, para melhorar o processo de regeneração. Estes biomateriais se classificam desta forma pois podem ser funcionalizados – em geometrias de interesse - com fatores de crescimento, nanopartículas e componentes de matriz extracelular (SHAFIQ *et al.*, 2016). As principais desvantagens relacionadas ao uso de biomateriais poliméricos são devido ao seu tempo de degradação no organismo, que pode ser consideravelmente longo dependendo do tipo de material a ser utilizado, a possibilidade de geração de uma resposta imunológica exacerbada e o desenvolvimento do *design* de porosidade do arcabouço, para ser possível obter um balanço ideal necessário entre propriedades mecânicas e respostas celulares apropriadas de sobrevivência, proliferação e migração quando *in vivo* (KOSUGE *et al.*, 2013; STRATTON *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2018).

Em Engenharia de Tecidos, três estratégias principais envolvem o uso de biomateriais: (1) o implante diretamente do biomaterial sem células; (2) o isolamento das células-tronco a partir de pacientes, sua semeadura imediata no biomaterial e (3) a coleta de células, sua expansão *in vitro* e semeadura no biomaterial utilizando fatores de crescimento ou outras pequenas moléculas antes do implante no local de defeito (IAQUINTA *et al.*, 2019).

Quando as células entram em contato com a superfície do biomaterial, o esperado é que ocorram três processos ordenados: (1) adesão inicial das células, (2) espraiamento celular e (3) formação de adesões focais, interações consideradas fortes entre as células e o arcabouço (PRZEKORA, 2019). Para regeneração de defeitos ósseos críticos, logo após o implante do biomaterial, a sua superfície é recoberta com plasma e proteínas teciduais, que serão reconhecidas pelos osteoblastos e células osteoprogenitoras (SCOTCHFORD *et al.*, 2002). O principal mecanismo de adesão dos osteoblastos na superfície do biomaterial é pelo receptor de integrinas. Claramente, esta adesão pode ser influenciada por propriedades estruturais e físico-químicas, como por exemplo: carga e tipo de topografia (PRZEKORA, 2019). Com o intuito de mimetizar esse processo de regeneração de defeitos ósseos críticos e avaliar a função de biomateriais, diferentes modelos de defeito foram desenvolvidos em animais, como em fêmur de ratos ou coelhos e defeito ósseo crítico em calvária de ratos ou coelhos (GOMES e FERNANDES, 2011; HAN *et al.*, 2018).

Entretanto, abordagens clássicas na Engenharia de Tecidos apresentam desvantagens relacionadas com a menor viabilidade celular no interior dos arcabouços, pela maior dificuldade de difusão de nutrientes, e com a manutenção do controle das propriedades físicas e mecânicas do arcabouço por longos períodos (GUDURIC *et al.*, 2017). Dessa maneira, a biofabricação de tecidos complexos ainda é considerada um desafio, de forma que abordagens não clássicas ou “*bottom-up*” (*do inglês*, de baixo para cima) estão sendo largamente exploradas como alternativa (ELBERT, 2011; URCIUOLO *et al.*, 2013). Neste tipo de abordagem, são produzidas estruturas teciduais modulares, a fim de alcançar um maior mimetismo com o tecido nativo. Essas estruturas podem ser representadas de diferentes formas, sendo que os esferoides 3D são os mais utilizados (NICHOL e KHADEMHOSEINI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013). Os esferoides 3D são formados a partir do processo de *self-assembly* ou auto-montagem em estratégias de cultivo “*scaffold-free*” (*do inglês*, livres de arcabouço) (NICHOL e KHADEMHOSEINI *et al.*, 2010), como será discutido em mais detalhes nos tópicos a seguir.

1.4.2 Abordagens livres de arcabouço (*scaffold-free*)

As abordagens livres de arcabouço (*scaffold-free*) apresentam como objetivo produzir tecidos por mimetizar processos do desenvolvimento embrionário, formando assim um microambiente mais semelhante ao encontrado *in vivo*. Normalmente, os processos em abordagens livres de arcabouço seguem etapas de condensação celular, proliferação, diferenciação, produção de matriz extracelular e maturação tecidual. Dentro de abordagens livres de arcabouço, ocorre o processo de auto-montagem ou *self-assembly* (um fenômeno modular), no qual não há forças externas dirigindo a formação das estruturas 3D ou esferoides (DU RAINE *et al.*, 2015; THOMAS *et al.*, 2016).

Na primeira fase do processo de auto-montagem, uma elevada densidade de suspensão celular é semeada em moldes não aderentes (como ocorre na técnica de hidrogel de agarose micromoldado) para garantir que somente interações celulares irão dirigir a formação tecidual. Segundo, uma mimetização espontânea de energia livre promove a interação célula-célula por moléculas de adesão, como as caderinas. Em seguida, inicia-se a produção de matriz

extracelular e, por fim, essa matriz extracelular sofre maturação para formar os esferoides (ACHILLI *et al.*, 2012; DU RAINE *et al.*, 2015).

Os esferoides já foram utilizados para fabricação de diferentes tecidos, como, por exemplo tecido cardíaco (CAMPBELL *et al.*, 2018), epitelial (GRANATO *et al.*, 2017) e hepático (BELL *et al.*, 2016). No caso de tecido ósseo, esferoides fabricados a partir de MSCs ou ASCs de fonte humana ou animal, já foram utilizados em estudos como um modelo *in vitro* e/ou *in vivo* de regeneração óssea (LASCHKE *et al.*, 2014; SUENAGA *et al.*, 2015; MURATA *et al.*, 2015). No entanto, o número desses estudos, principalmente com ASCs, é relativamente baixo na literatura (BAPTISTA, KRONENBERGER *et al.*, 2018) e a maioria das estratégias realiza a comparação com modelos em monocamada (2D) (YAMAGUCHI *et al.*, 2014), não explorando a dinâmica de diferenciação em relação a presença de diferentes moléculas de matriz extracelular características deste tecido, a expressão de fatores de transcrição e a funcionalidade do modelo, que pode por exemplo, ser avaliada por ensaios de resistência mecânica.

Previamente, foi publicado um modelo padronizado de diferenciação osteogênica *in vitro* utilizando esferoides de ASCs, que passaram por um estágio de diferenciação em duas etapas (fase condrogênica e osteogênica) de maior funcionalidade (KRONENBERGER, 2018). Os esferoides, cultivados durante cinco semanas, apresentaram homogeneidade de tamanho e forma por todo o período de cultivo, a presença de depósitos de cálcio – ao final de cinco semanas - e elevada positividade para proteínas colagenosas e não colagenosas tipicamente encontradas na matriz extracelular do tecido ósseo, como: colágeno I, osteocalcina, osteopontina e biglicana (KRONENBERGER, 2018; KRONENBERGER *et al.*, 2020). Um dado interessante foi a intensa marcação de colágeno X, secretado por condrócitos hipertróficos em eventos de ossificação endocondral e a ausência da proteína anti-angiogênica TSP-1, também em cinco semanas (Fig. 6).

Esse conjunto de dados preliminares impulsionaram a investigação de mecanismos moleculares, o padrão de citocinas secretadas por esses esferoides e análises refinadas de ultraestrutura para avaliar a existência de estrutura mineral, os quais serão apresentados a frente neste trabalho na seção de resultados.

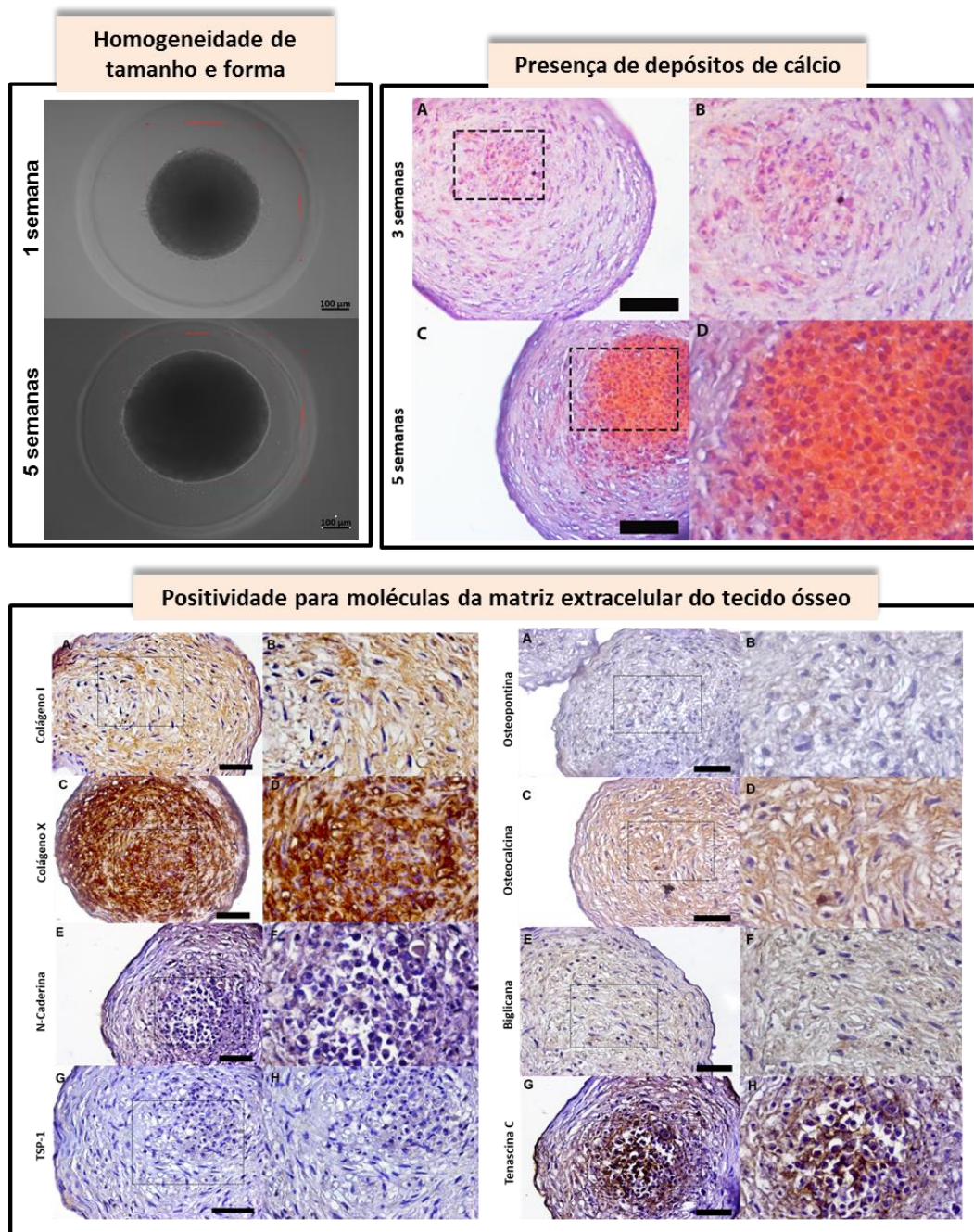


Figura 6: Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica por uma abordagem de indução em duas etapas. Quando induzidos a partir dessa abordagem, os esferoides, cultivados durante cinco semanas, apresentam elevada homogeneidade de tamanho e forma (imagens obtidas por microscópio de contraste de fase), o aumento de depósitos de cálcio extracelulares até o final do período de cultivo (coloração de Alizarina vermelha) e positividade para moléculas colagenosas e não colagenosas tipicamente encontradas na matriz extracelular do tecido ósseo em cinco semanas de cultivo (reação de imunohistoquímica) (adaptado de KRONENBERGER, 2018; KRONENBERGER *et al.*, 2020).

Dentre as abordagens livres de arcabouço, o uso de esferoides fusionados como um modelo *in vitro* de organogênese e diferenciação foi pouco explorado até o momento. A fusão tecidual é um processo espontâneo no

desenvolvimento embrionário e ocorre por interações célula-célula e célula-matriz extracelular, envolvendo etapas moleculares e biofísicas complexas (YANG *et al.*, 2012; BELAIR *et al.*, 2017) que culminam na formação das estruturas de tubo neural, formação esquelética e miocárdica (RAGO *et al.*, 2009). Quando esferoides são utilizados para replicar esse fenômeno, o processo é controlado por forças de tensão superficial ou a capacidade de posicionar esferoides para se fusionarem como uma única estrutura coesa (VISCONTI *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012). Uma vantagem da fusão de esferoides é que as alterações cinéticas e morfológicas deste modelo podem ser facilmente quantificadas com um rendimento elevado, utilizando inicialmente imagens de campo claro ou contraste de fase. Em seguida, as imagens obtidas podem ser analisadas com um *script* personalizado de análise de imagens pelo uso de *softwares* específicos (SUSIENKA *et al.*, 2016). Sendo assim, é possível avaliar eventos celulares, como migração e diferenciação de células em esferoides fusionados.

A propriedade de fusão tecidual dos esferoides é que permite sua aplicação como blocos de construção em técnicas de bioimpressão 3D (MIRONOV *et al.*, 2009). A técnica de bioimpressão 3D faz parte de abordagens de biofabricação em medicina regenerativa, assim como as abordagens de *self-assembly* ou auto-montagem (GROLL *et al.*, 2016). Devido ao grande potencial da bioimpressão 3D, diferentes estudos estão sendo publicados para a biofabricação de construídos com propriedades morfofuncionais mais similares ao tecido nativo. Nos próximos tópicos, será feita uma discussão da bioimpressão 3D como estratégia de biofabricação para a área de medicina regenerativa, assim como da aplicação de esferoides como blocos de construção para o desenvolvimento de modelos teciduais mais complexos.

1.5 ESTRATÉGIAS DE BIOFABRICAÇÃO NO CONTEXTO DA MEDICINA REGENERATIVA A PARTIR DA BIOIMPRESSÃO 3D

1.5.1 A técnica de bioimpressão 3D na área de medicina regenerativa

A bioimpressão 3D é uma abordagem emergente que pode ser considerada uma das mais promissoras para a biofabricação de tecidos em grande escala nos próximos anos. A bioimpressão 3D se originou da manufatura aditiva, onde células, biomateriais e fatores solúveis podem ser arranjados camada por camada (MANDRYCKY *et al.*, 2016). A partir da bioimpressão 3D, é possível organizar hierarquicamente os tecidos conforme eles são encontrados *in vivo* e, então, reproduzir fielmente suas propriedades morfológicas e funcionais. Ao mesmo tempo, os construídos biofabricados podem ser posteriormente maturados *in vitro* ou *in vivo* para adquirir as propriedades biomecânicas funcionais desejadas (DATTA *et al.*, 2018).

As principais técnicas de bioimpressão 3D são (1) jato de tinta, (2) baseada em extrusão e (3) assistida por laser (Fig. 7) (HUANG *et al.*, 2017). Na bioimpressão a jato de tinta, é possível controlar com precisão tanto o padrão de tamanho do tecido desejado, assim como a densidade celular nas gotas geradas. Desta forma, é possível determinar o volume, o tamanho e a quantidade de uma amostra a ser bioimpressa. Em termos de precisão, é possível controlar o número de células por gotículas, o que é uma vantagem quando são utilizados arcabouços, pois o povoamento celular será mais eficiente (ZHANG E ZHANG, 2015).

A bioimpressão baseada em extrusão é a técnica mais utilizada e o princípio é combinar um sistema de dispensação de fluido com um robótico para a extrusão de materiais biológicos ou não. O sistema de distribuição de fluido pode ser dirigido por forças pneumáticas, mecânicas ou por parafuso. Por meio da bioimpressão baseada em extrusão é possível precisar a deposição de células, que podem ser encapsuladas em filamentos geométricos pré-estabelecidos e, em seguida, bioimpressa (OZBOLAT *et al.*, 2016). No entanto, um dos maiores desafios dessa técnica é o nível de resolução que pode ser alcançado (NING E CHEN, 2017).

A bioimpressão assistida por *laser* é baseada no princípio de transferência direta induzida por *laser* e permite controlar com precisão a deposição virtual de células, fatores de crescimento e biomateriais contendo gotículas em uma velocidade de intervalo de MHz. Portanto, com essa técnica é possível atingir níveis de alta resolução (DEVILLARD *et al.*, 2014). No entanto, a principal desvantagem é a possibilidade de prejuízo na viabilidade celular devido ao uso do *laser* (DERAKHSHANFAR *et al.*, 2018).

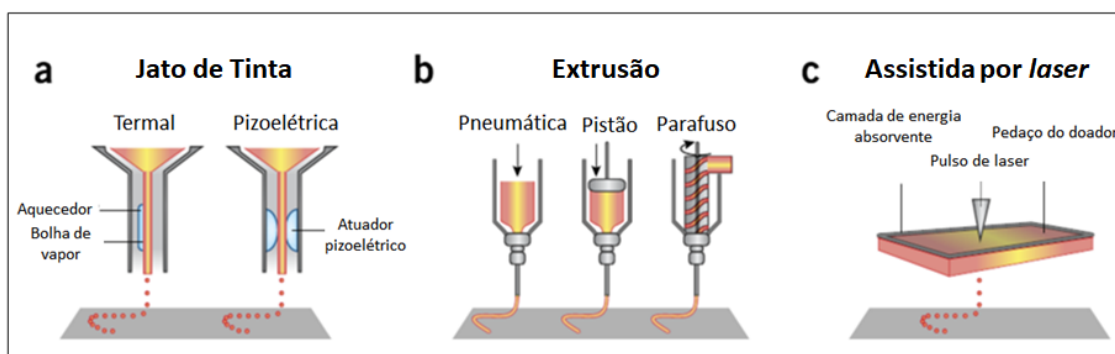


Figura 7: Tipos de bioimpressão 3D. (A) na bioimpressão por jato de tinta, estímulos térmicos, pizoelétricos ou acústicos produzem pulsos de ar que forçam a formação de gotas a partir do bico da bioimpressora. (B) as bioimpressoras de extrusão utilizam sistemas pneumáticos ou mecânicos (por pistão ou parafuso) para extrusar filamentos contínuos de biomaterial ou biomaterial com células. (C) na bioimpressão assistida por laser, um laser é focado em um substrato absorvente para impulsionar materiais por pressão, contendo componentes celulares, em um substrato coletor (adaptado de MURPHY e ATALA, 2014).

Normalmente, a bioimpressão 3D começa com uma etapa em *software* computacional para gerar o modelo do construído desejado, o qual pode ser a partir da deposição de biomateriais biologicamente relevantes, fatores de crescimento e células vivas ou esferoides. Basicamente, é possível dividir o processo de bioimpressão 3D em três etapas: (1) pré-processamento para aquisição do modelo 3D de desenho assistido por computador do tecido a ser bioimpresso, (2) deposição automatizada de células, esferoides, biomateriais ou outros componentes biológicos de interesse e (3) maturação dos construídos de tecidos (ZHANG *et al.*, 2017).

A fim de desenvolver fielmente o construído tecidual desejado, a escolha da biotinta é uma das etapas cruciais. A biotinta pode ser definida como uma formulação biocompatível de materiais com células vivas ou esferoides que pode

ser inserida em uma bioimpressora 3D especialmente projetada. A biotinta irá fornecerá as propriedades físicas e bioquímicas para guiar a proliferação, diferenciação e maturação final das células no construído biofabricado. Dessa forma, como todo biomaterial, a biotinta deve conter propriedades similares ao tecido quando *in vivo* (GOPINATHAN E NOH, 2018). Diversas formulações de biotintas já foram desenvolvidas, como matriz extracelular descelularizada, alginato, gelatina, ácido hialurônico e polímeros para serem usados com células ou mesmo esferoides durante o processo de bioimpressão 3D (PARAK *et al.*, 2019).

A bioimpressão 3D já foi utilizada para a biofabricação de diferentes tecidos. Os principais estudos com bioimpressão 3D publicados até o momento foram realizados para biofabricar estruturas vasculares, tecido cardíaco, pele, cartilagem e tecidos ósseos (VIJAYAVENKATARAMAN *et al.*, 2018). No caso de construídos vasculares, estudos são desenvolvidos há mais de uma década com bioimpressão 3D (CUI e BOLAND, 2009; MIRONOV *et al.*, 2009). Em estudos vasculares, a principal fonte de células utilizadas são HUVECs e MSCs; para biofabricação de osso e cartilagem, a maioria dos estudos foi realizada com MSCs de medula óssea; para estudos de tecido cardíaco as principais fontes de células são MSCs ou iPSCs e para biofabricação de pele, a maioria dos estudos foram realizados com linhagens celulares ou fibroblastos humanos. Em geral, entre os estudos já publicados, a bioimpressão baseada em extrusão é a principal abordagem utilizada (VIJAYAVENKATARAMAN *et al.*, 2018).

No entanto, a maioria dos estudos publicados até o momento foi realizada com suspensões de células e não com esferoides como blocos de construção. Como os esferoides são considerados o principal tipo de abordagem livre de arcabouços em Engenharia de Tecidos, o desenvolvimento de estudos com esferoides como componentes das biotintas para bioimpressão 3D estão sendo cada vez mais explorados.

1.5.2 O uso de esferoides como blocos de construção em técnicas de bioimpressão 3D

É sabido que abordagens “*bottom-up*” visam a produção de blocos de construção, como discutido anteriormente, utilizando uma linha de produção

automatizada, o que gerou o conceito de biofabricação de tecidos (RIVON *et al.*, 2009). Devido à capacidade dos esferoides em recapitular os principais eventos morfogênicos, incluindo a fusão, eles podem ser utilizados como blocos de construção na técnica de bioimpressão 3D (Fig. 8) (VISCONTI *et al.*, 2010; LASCHKE e MENDER, 2017).

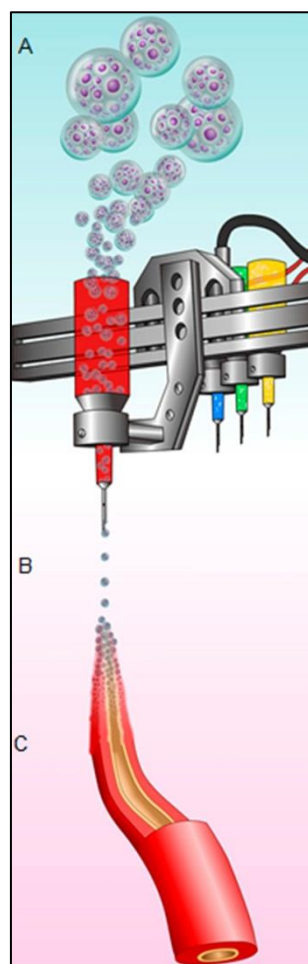


Figura 8: Esferoides como blocos de construção para abordagens de bioimpressão 3D. Os esferoides inicialmente são encapsulados em um hidrogel (A) e então dispensados em aproximação um do outro pela bioimpressora 3D (B). Então, os esferoides iniciam o processo de fusão tecidual para formar uma estrutura tecidual mais complexa, em uma forma pré-definida (C) (BAPTISTA, KRONEMBERGER *et al.*, 2018).

Atualmente, uma ferramenta que também pode ser utilizada em associação com a bioimpressão 3D, e que está sendo largamente explorada, é o uso de modelos computacionais para prever o comportamento de componentes biológicos em um microambiente de cultivo ou até mesmo *in vivo*. No artigo publicado por ROBU e colaboradores (2019), simulações

computacionais foram feitas para considerar os esferoides bioimpressos em um arranjo pré-determinado em uma biotinta de sacrifício contendo células endoteliais dispersas (em verde). Os resultados mostraram que é possível o desenvolvimento desse modelo para promover a formação de uma rede de canais mais complexa e com alta resolução após o processo de bioimpressão (Fig. 9).

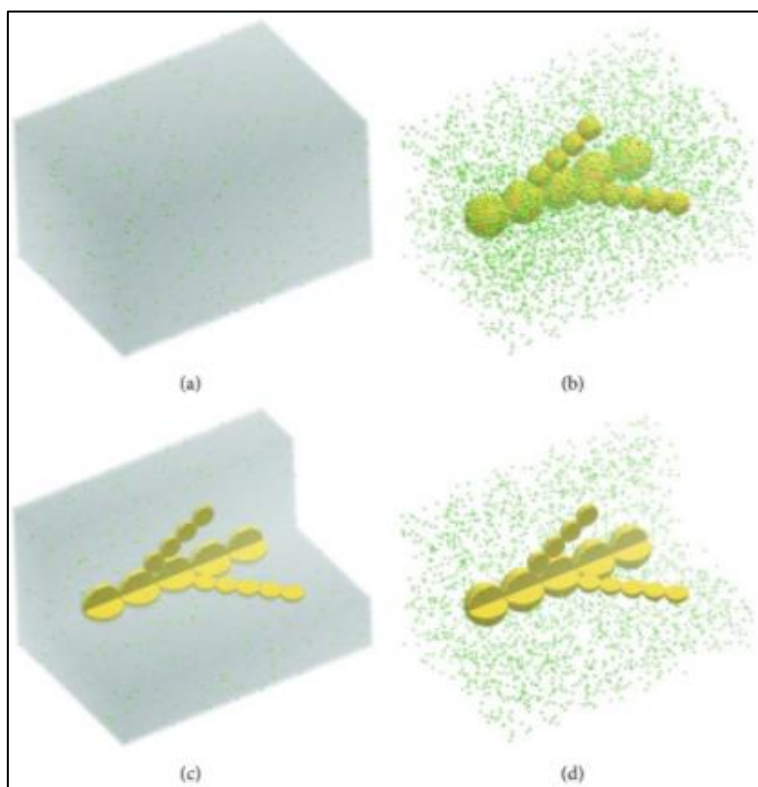


Figura 9: Estratégia de simulação computacional considerando os esferoides como blocos de construção em uma biotinta de sacrifício com células endoteliais. (A) hidrogel de sacrifício com células endoteliais em verde. (B) esferoides como blocos de construção com as células endoteliais. (C) esferoides no interior do hidrogel de sacrifício com as células endoteliais. (D) após a remoção da biotinta de sacrifício, esferoides se mantêm unidos com as células endoteliais ao seu redor (adaptado de ROBU *et al.*, 2019).

Os esferoides já foram utilizados em abordagens de bioimpressão, principalmente devido a sua propriedade de fusão tecidual e o número de estudos realizados nesse contexto estão aumentando consideravelmente nos últimos anos (Fig. 10). Para atender limitações técnicas de trabalhar com esferoides como componente da biotinta, novos métodos para biofabricação de

construídos foram desenvolvidos, como as técnicas de bioimpressão assistida, o método de Kenzan e a combinação de métodos pré-existentes.

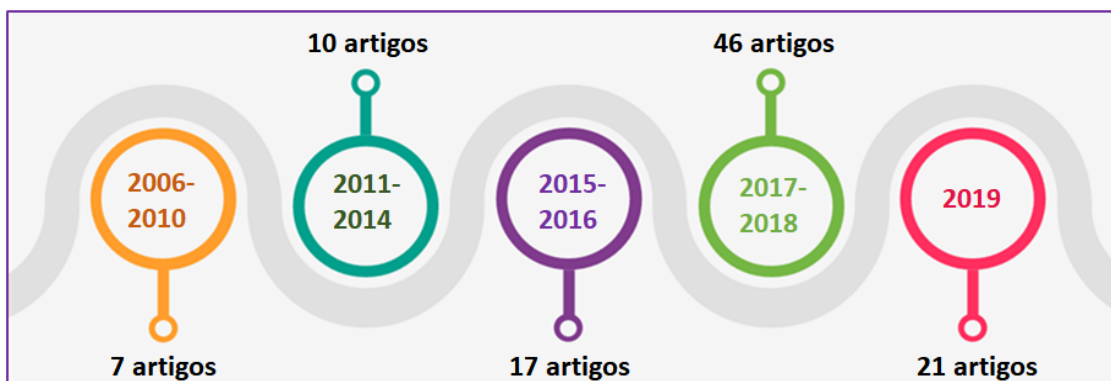


Figura 10: Linha do tempo do número de estudos realizados utilizando esferoides em abordagens de bioimpressão 3D. Observe que por mais que seja uma área considerada recente na literatura, o número de estudos está aumentando ao longo dos anos (base de dados: Pubmed. Busca realizada em 12/11/2019 às 21:30).

No estudo realizado por NOROTTE e colaboradores (2009), os autores utilizaram a técnica de extrusão para a bioimpressão de células musculares lisas e fibroblastos, os quais por sua vez foram agregados em esferoides ou em cilindros de diâmetro controlável. Os componentes foram bioimpressos camada por camada concomitantemente com cilindros de agarose, que foram utilizados como um molde para permitir a maturação e fusão das estruturas. A fusão pós-impressão das unidades discretas resultou em tubos vasculares de pequeno diâmetro de camada única e dupla, organizados hierarquicamente e com propriedades morfológicas tipicamente encontradas em tecidos vasculares (Fig. 11).

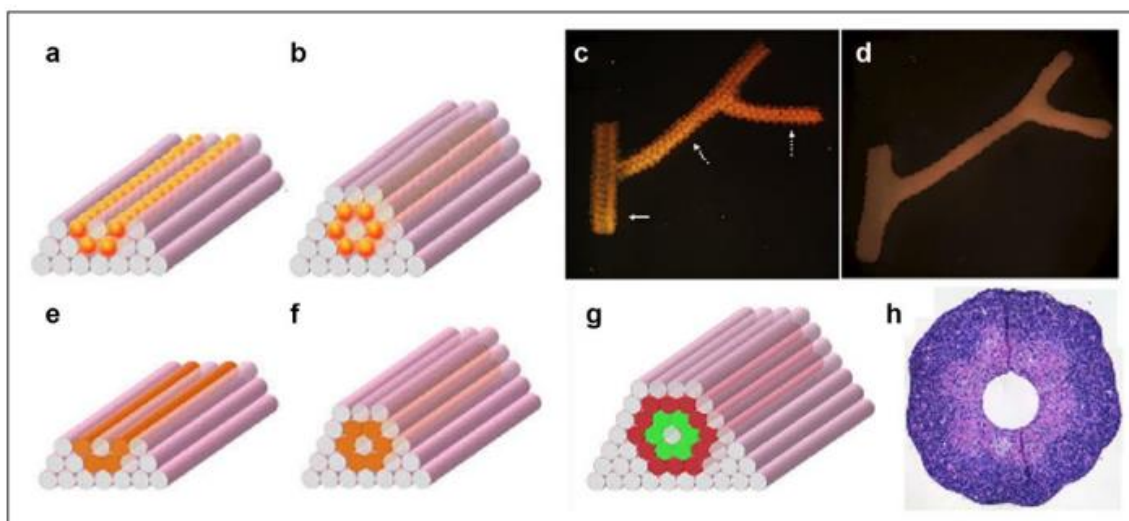


Figura 11: Abordagem livre de arcabouços a partir da extrusão de cilindros contendo componentes celulares de vasos sanguíneos e esferoides. (A-B) *Design* dos cilindros para serem bioimpressos contendo as células endoteliais e os esferoides ao redor do cilindro central. (C-D) Processo de fusão dos esferoides em um formato similar ao de uma árvore vascular. (E-G) Processo de maturação do construído após a bioimpressão, onde em (G), cada cor representa um tipo celular endotelial diferente. (H) Coloração histológica do construído após completado o processo de fusão (adaptado de NOROTTE *et al.*, 2009).

No trabalho realizado por BENMERIDJA e colaboradores (2020) esferoides de co-cultivo entre HUVECs e ASCs foram formados em grande quantidade e tamanho ideais para serem utilizados em abordagens de bioimpressão 3D. Os esferoides foram bioimpressos em um padrão pré-definido a partir do método de extrusão e a biotinta utilizada foi o GelMA. Os resultados mostraram que os esferoides se mantiveram viáveis após o processo de bioimpressão e que sua morfologia não foi prejudicada.

No método de “Kenzan”, é possível realizar o posicionamento automatizado dos esferoides em arranjos 3D, posicionando-os em microagulhas que são espaçadas o suficiente para permitir a fusão dos esferoides. As forças de deformação causadas pela distorção dos esferoides durante a montagem não afetam a viabilidade celular, a produção de matriz extracelular ou a fusão (Fig. 12) (DALTON *et al.*, 2020). A partir das camadas de esferoides formadas pelo método de “Kenzan”, estruturas tubulares e tecidos heterogêneos já foram fabricados usando tipos e posições de esferoides apropriados. Por exemplo, a partir desse método, já foi feita a formação de fragmentos microvasculares a

partir da fusão dos esferoides de células-tronco pluripotentes induzidas e células endoteliais (DALTON *et al.*, 2020).

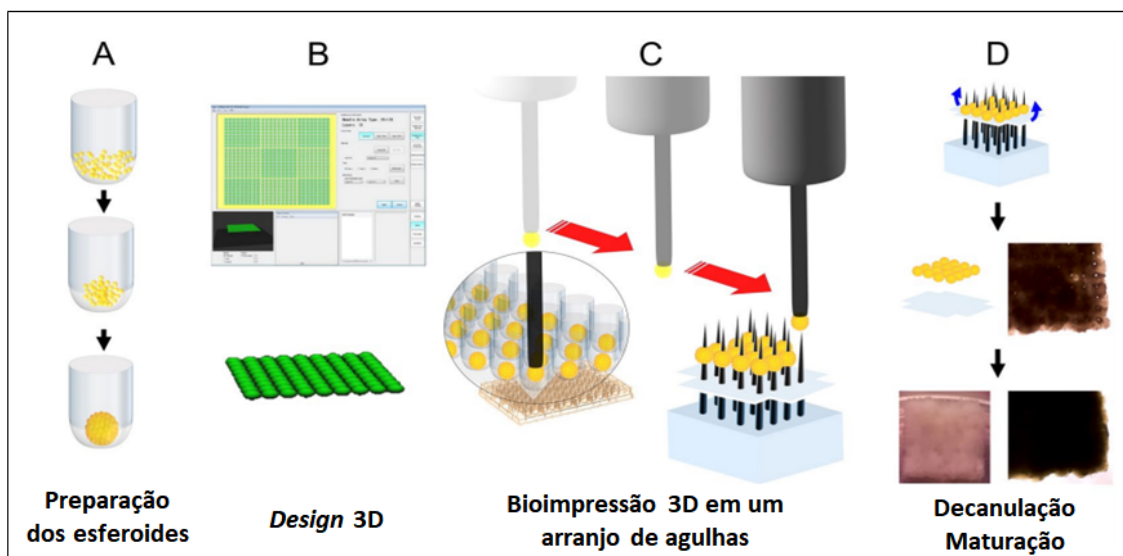


Figura 12: Estratégia de biofabricação utilizando esferoides a partir do método de Kenzan. (A) Fabricação de esferoides. (B) *Design 3D* do construído a ser produzido. (C) Processo de bioimpressão 3D a partir do posicionamento de um esferoide por vez em um arranjo de agulhas projetadas. (D) Remoção das agulhas e maturação do construído a partir do processo de fusão dos esferoides (adaptado de DALTON *et al.*, 2020).

Outra abordagem que está sendo muito explorada atualmente é a bioimpressão assistida por posicionamento, onde é possível posicionar automaticamente esferoides individualizados em um hidrogel de suporte a partir de uma estrutura pré-definida. Após o posicionamento, os esferoides se fusionam e formam um tecido de maior complexidade. No artigo publicado por DALY e colaboradores (2021), foi realizada a bioimpressão assistida de esferoides de células-tronco pluripotentes induzidas para formação de um microtecido cardíaco. No entanto, essa abordagem também pode ser aplicada para formação de estruturas microvasculares e perfusáveis (Fig. 13).

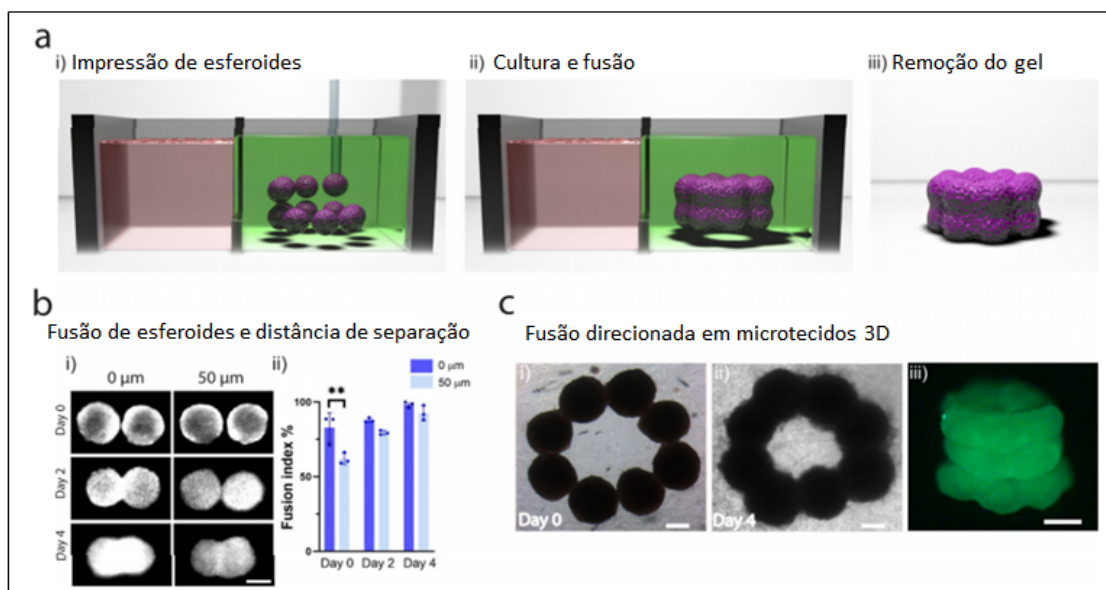


Figura 13: Etapas do método de biofabricação por bioimpressão assistida com esferoides. (A, i) Bioimpressão de um esferoide por vez em uma estrutura pré-definida no hidrogel de suporte. (A, ii) Processo de cultivo e fusão tecidual dos esferoides. (A, iii) Remoção do hidrogel de suporte e manutenção somente do construído formado pela fusão dos esferoides. (B) Quantificação do processo de fusão dos esferoides ao longo dos dias em cultivo. (C) Imagens de contraste de fase do processo de fusão dos esferoides e de viabilidade celular (adaptado de DALY *et al.*, 2021).

Por fim, uma abordagem considerada nova e promissora na literatura para bioimpressão de tecidos “soft”, sem a necessidade de um arcabouço polimérico, é o *freeform reversible embedding of suspended hydrogels* (FRESH, do inglês, incorporação reversível de forma livre de hidrogéis suspensos). A vantagem de utilizar essa abordagem é a capacidade de incorporar biotintas do tipo “soft” em um banho de suporte térmico reversível, em tamanhos que variam de alguns milímetros a centímetros, ou seja, em uma maior escala. O banho de suporte é degradado gradativamente, justamente por ser sensível a temperatura biológica, e a biotinta irá se manter na estrutura devido a capacidade de fusão dos componentes biológicos (MIRDAMADI *et al.*, 2020). No artigo realizado por SKYLAR-SCOTT e colaboradores (2019), foi feita a biofabricação de centenas de milhares de organoides em matrizes vivas com alta densidade celular, nas quais canais vasculares perfusáveis foram introduzidos por meio da técnica de FRESH. Além de atingir uma alta densidade celular, devido à grande quantidade de organoides, os canais vasculares foram biofabricados com sucesso (Fig. 14).

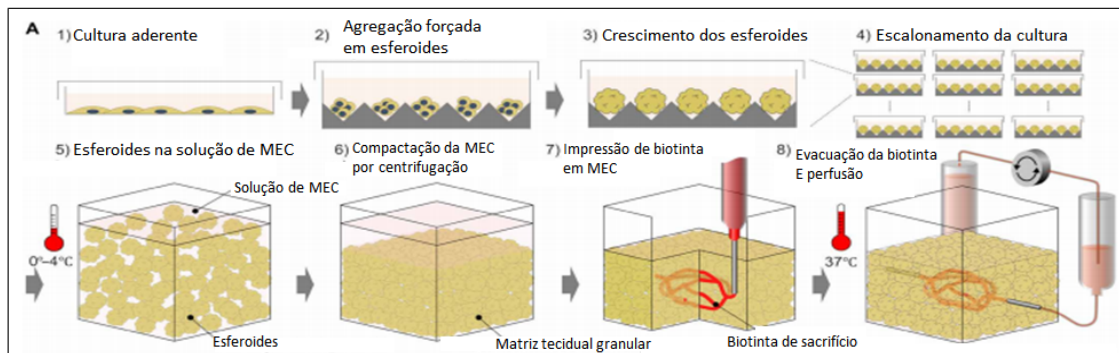


Figura 14: Estratégia de biofabricação livre de arcabouço a partir do método FRESH utilizando esferoides. Inicialmente, os esferoides são produzidos em larga escala a partir do cultivo 2D de monocamada (1-4). Em seguida, os esferoides foram depositados em um banho de suporte e neste banho de suporte, foi feita a impressão de uma biotinta de sacrifício para permitir a perfusão vascular (5-8). Com a remoção do banho de suporte e da biotinta de sacrifício, somente os esferoides permaneceram no construído e um canal perfusável foi formado na estrutura (adaptado de SKYLAR-SCOTT *et al.*, 2019).

1.6 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA A BIOFABRICAÇÃO DE TECIDO ÓSSEO

Como discutido anteriormente, a técnica de bioimpressão 3D está emergindo como uma das mais promissoras na área de Engenharia de Tecidos, principalmente por permitir um arranjo espacial mais organizado de células, esferoides, fatores de crescimento e biomateriais (DALY *et al.*, 2016). Diferentes estudos já exploraram o potencial de translação da técnica de bioimpressão 3D para a clínica e atualmente, um dos tecidos que está sendo mais investigado para essa finalidade é o tecido ósseo (ORCIANI *et al.*, 2017). Dentre os principais motivos, destacam-se: 1) a maior reprodutibilidade na produção de biomateriais, 2) a possibilidade de customização e 3) a maior complexidade estrutural alcançada a partir da bioimpressão 3D, a qual permite, portanto, mimetizar a organização estrutural desse tecido de forma mais fidedigna (TANG *et al.*, 2015). A partir deste contexto, neste tópico serão descritas abordagens recentes para biofabricação do tecido ósseo, a partir da bioimpressão 3D.

No trabalho realizado por DALY e colaboradores (2016), os autores desenvolveram uma estratégia de bioimpressão 3D de biotintas com elevadas propriedades mecânicas inspirada na biologia do desenvolvimento do tecido ósseo. O construído desenvolvido foi baseado em uma formulação de biotinta de gelatina metacrilada (GelMA) com bmMSCs induzidas para a via condrogênica,

a qual foi em seguida combinada com um arcabouço de PCL, com e sem canais vasculares. Os resultados principais mostraram que uma vez *in vivo*, os construídos bioimpressos foram capazes de suportar o processo de ossificação endocondral, uma vez que foi observada elevada produção de tecido ósseo e de regiões vascularizadas no local do implante subcutâneo (Fig. 15).

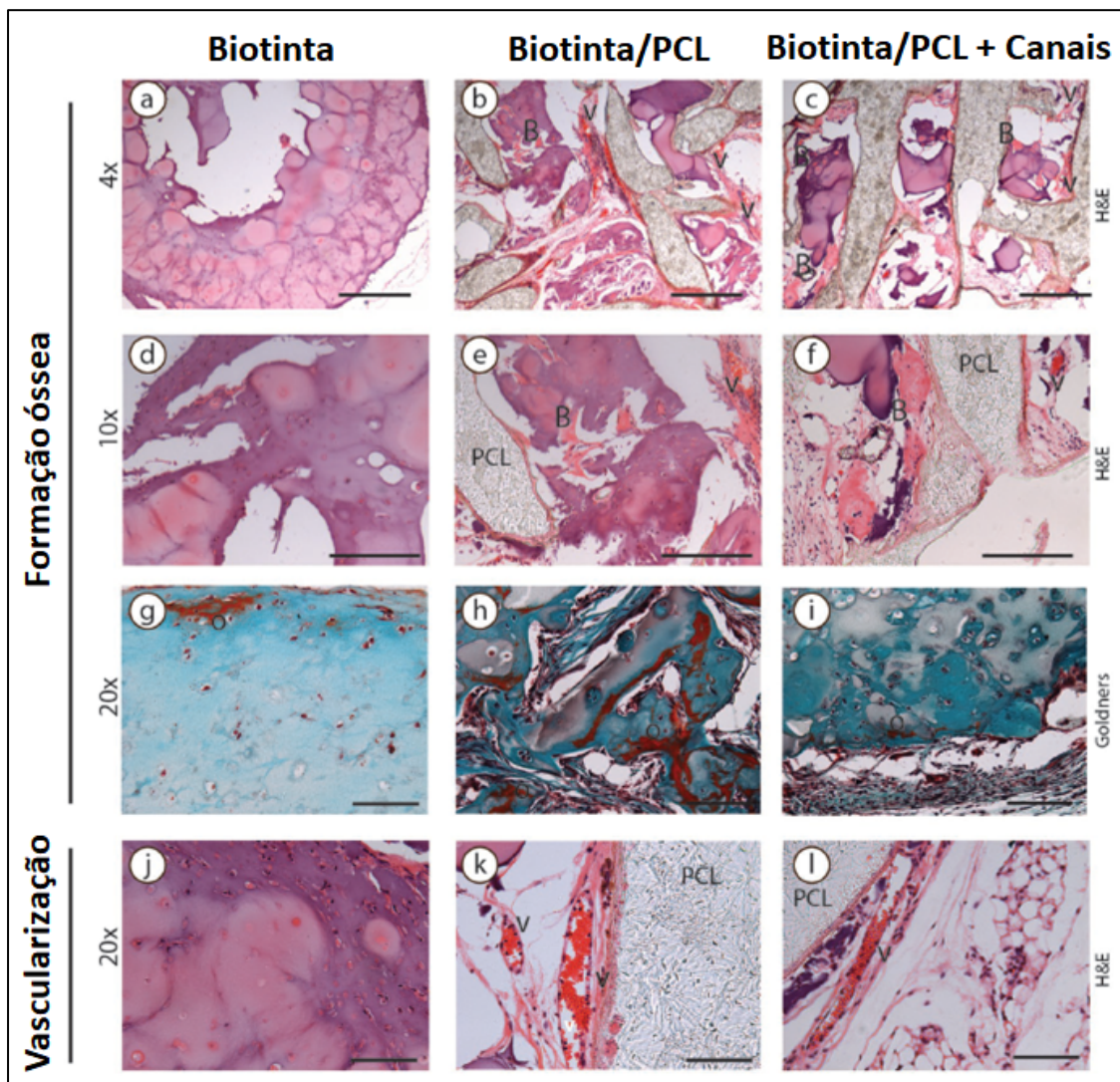


Figura 15: Estratégia a partir de construídos bioimpressos suporta o processo de ossificação endocondral *in vivo*. Após 12 semanas de implante subcutâneo, os autores observaram a formação de tecido ósseo novo a partir das colorações de Hematoxilina e Eosina (A-F) e Tricomo de Golden (G-I). Em adição, foi observada nova vascularização no local do implante (J-L), em proximidade com os construídos (adaptado de DALY *et al.*, 2016).

Um artigo publicado por BYAMBAA e colaboradores (2017) mostrou o desenvolvimento de um construído complexo focado no tecido ósseo e na sua porção vascular, a partir da técnica de extrusão. Para o desenvolvimento do

construído, os autores utilizaram hidrogéis a base de GelMA funcionalizados com fatores endoteliais solúveis, nanopartículas e MSCs. No centro do construído, foi utilizado GelMA a uma baixa concentração como biotinta de sacrifício, contendo células endoteliais. Os resultados mostraram que a biotinta de sacrifício foi degradada a temperatura biológica, formando um canal perfusável, e que as células endoteliais se organizaram e ficaram aderidas no biomaterial circundante (Fig. 16).

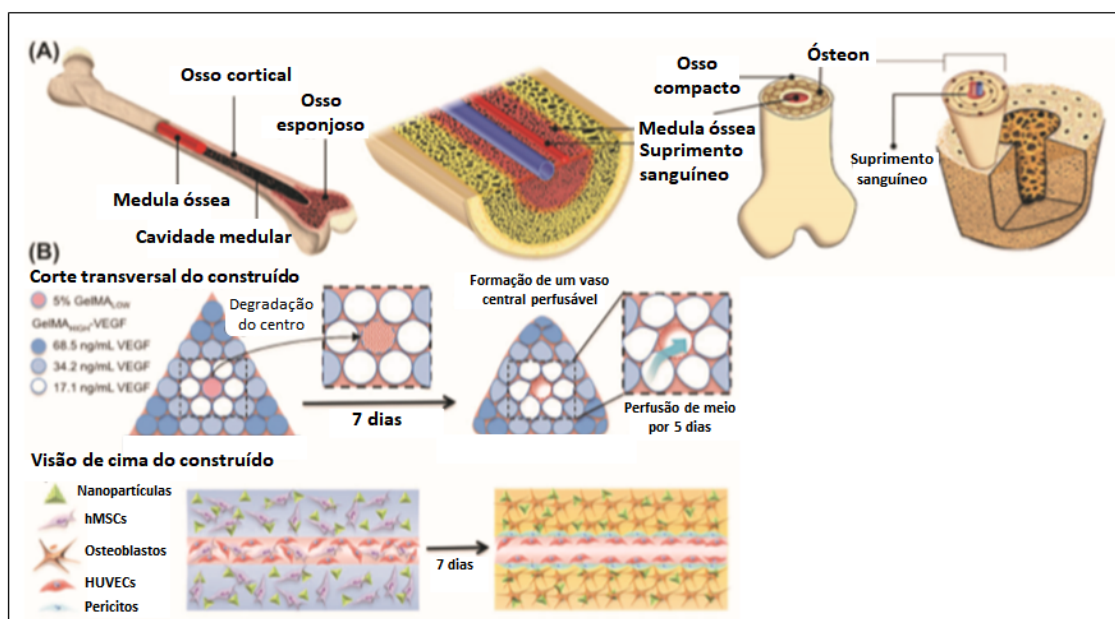


Figura 16: Estratégia para biofabricação de um construído ósseo com a porção vascular a partir da bioimpressão 3D por extrusão. (A) complexidade estrutural do tecido ósseo. (B) nessa abordagem, foi feita a extrusão de cilindros de biotinta contendo concentrações diferentes de VEGF com MSCs e nanopartículas e na porção interior, foi extrudada uma camada de biotinta de sacrifício com células endoteliais (adaptado de BYAMBAA *et al.*, 2017).

No trabalho realizado por FREEMAN e colaboradores (2019), foi realizada a bioimpressão 3D de arcabouços de PCL com matriz extracelular óssea, a fim de permitir propriedades mecânicas mais elevadas e uma melhor adesão das células na superfície do biomaterial. Após o período de implante *in vivo*, os autores observaram que os arcabouços que apresentaram um maior tamanho de poro suportaram o processo de vascularização e de formação óssea em menos tempo, quando comparado com tamanhos de poros menores. Além disso, a adição da matriz extracelular óssea ao construído mostrou-se favorável para permitir um aumento da adesão das células *in vitro* e uma infiltração maior de vasos sanguíneos *in vivo* (Fig. 17).

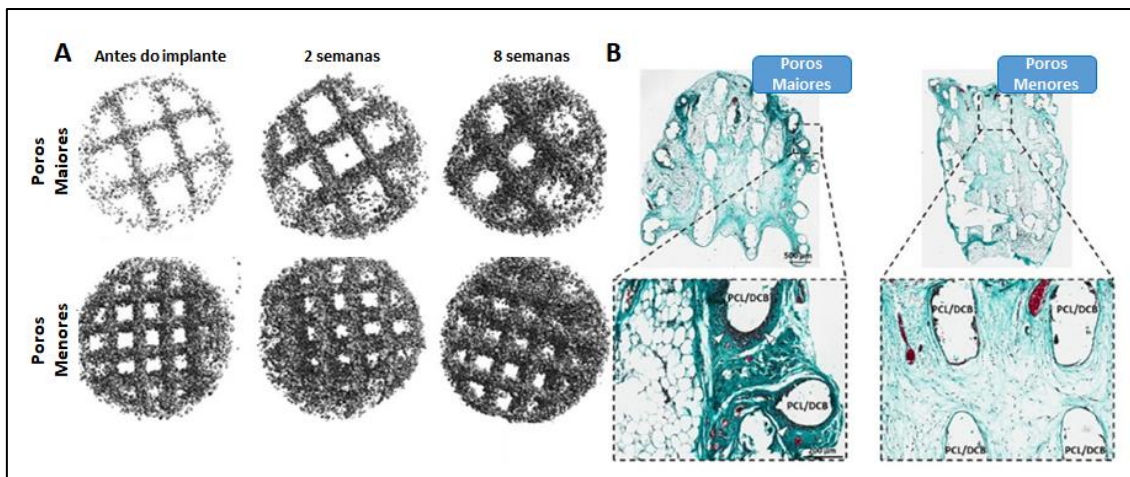


Figura 17: Construído bioimpresso com maior tamanho de poro desenvolve uma melhor resposta para formação de tecido ósseo *in vivo*. (A) Reconstrução por microtomografia de ambos os arcabouços antes, 2 semanas e 8 semanas pós implante. (B) Coloração por Tricoma de Masson de ambos os arcabouços após 8 semanas do período de implante. Observe que no grupo com maior tamanho de poro, foi observada maior intensidade de tecido ósseo formado (verde escuro) em proximidade com a região do biomaterial de PCL (adaptado de FREEMAN *et al.*, 2019).

No artigo desenvolvido por YANG e colaboradores (2020) foi realizada a biofabricação de uma rede morfológicamente funcional e viável de osteócitos *in vitro*, a partir da técnica de bioimpressão 3D. Os autores desenvolveram biotintas baseadas em GelMA e em ácido hialurônico (HA, do inglês, *hyaluronic acid*) com ou sem colágeno I. Os principais resultados mostraram que os construídos com a presença de colágeno I, após período de cultivo em meio indutor de mineralização, apresentaram um aumento nas conexões celulares dendríticas e aumento da produção de matriz extracelular mineralizada (Fig. 18). Além disso, foi observada uma elevada expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de osteócitos.

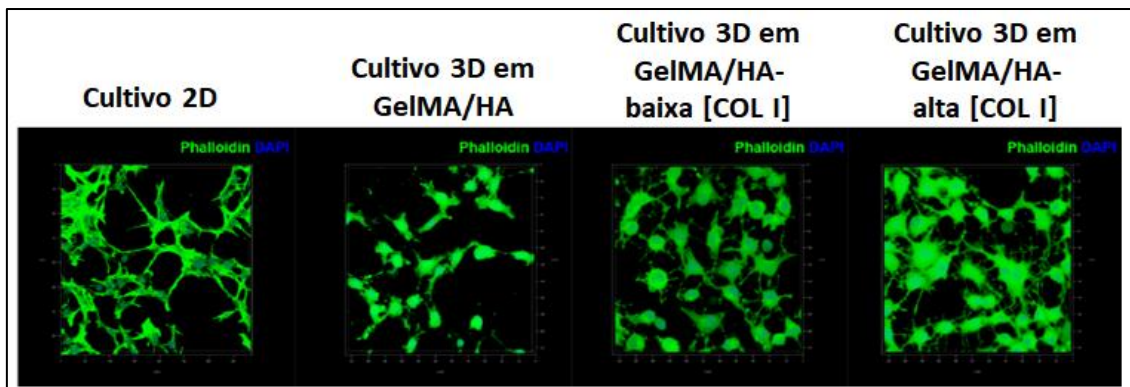


Figura 18: Biofabricação de uma rede funcional de osteócitos a partir da técnica de bioimpressão 3D. Imagens de microscopia confocal de fluorescência dos osteócitos bioimpressos nas biotintas após 28 dias de cultivo. Observe que os construídos contendo uma alta concentração de colágeno I, apresentaram maior densidade celular e formação de conexões dendríticas (adaptado de YANG *et al.*, 2020).

Como foi discutido, diferentes estratégias em biofabricação estão sendo desenvolvidas para o tecido ósseo. No entanto, o número de trabalhos em biofabricação para este tecido com cultivo 3D ainda é limitado. Neste contexto, atualmente em Engenharia de Tecidos, uma abordagem que está sendo considerada é a combinação de estratégias baseadas em arcabouços com estratégias livres de arcabouço, ou seja, a combinação de esferoides 3D com arcabouços para alcançar a regeneração tecidual. Esta abordagem foi discutida pela primeira vez por OVSIANIKOV e colaboradores (2018) como uma estratégia sinérgica, que permite alcançar: uma maior densidade inicial de células, eventos de otimizados de mecanotransdução, a capacidade de auto-montagem e a funcionalização do construído com biomoléculas. É interessante destacar que tais propriedades não são obtidas com facilidade ao utilizar somente abordagens com esferoides ou somente baseadas com arcabouços sem componentes celulares (Fig. 19).

Essa estratégia sinérgica pode ser feita ao produzir os esferoides já no interior de arcabouços, como pelo uso de *locky-balls* (SILVA *et al.*, 2016; OVSIANIKOV *et al.*, 2018) ou pelo uso de microcâmaras que permitam a formação dos esferoides e diferenciação, como feito no trabalho de DALY e KELLY (2019) para uma abordagem em engenharia de cartilagem, que pode vir a ser adaptada para outros tecidos. Além disso, é possível associar esferoides pré-formados aos arcabouços, que sejam construídos de forma personalizada para o tamanho e forma dos esferoides, a fim de alcançar eventos de fusão –

levando a uma maior densidade celular inicial e outras propriedades descritas anteriormente (Fig. 19). No entanto, o uso combinado de esferoides com biomateriais para produzir um construído tridimensional de maior complexidade *in vitro*, com aplicações para regeneração óssea, ainda foi pouco explorado, de forma que há a necessidade de novos estudos para avaliar esta abordagem.

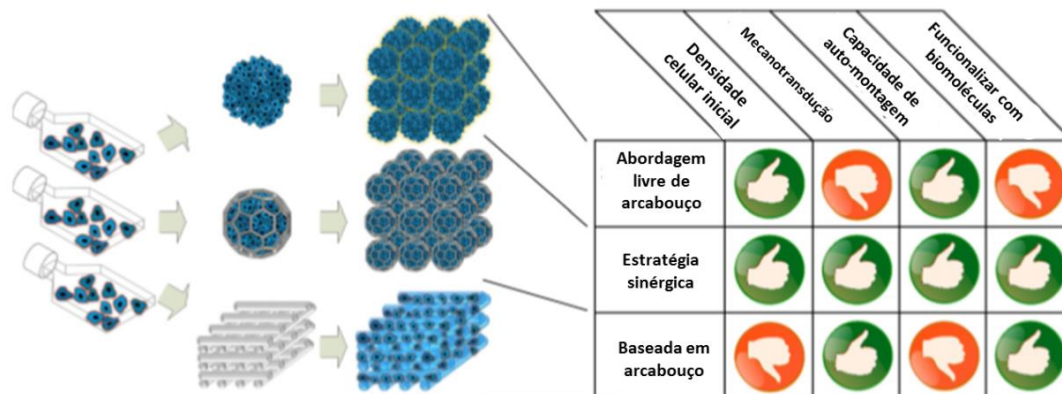


Figura 19: Representação esquemática de diferentes abordagens em engenharia de tecidos. As células expandidas (esquerda) podem ser utilizadas para semeadura em arcabouços (C) para produzir construídos de Engenharia de Tecidos na estratégia baseada em arcabouço; (A) também podem ser utilizadas para produzir esferoides para produzir construções livres de arcabouços e (B) podem ser utilizadas para produzir esferoides diretamente no interior de arcabouços, que em seguida serão montados em uma construção 3D para gerar uma construção coesiva via fusão entre os esferoides em uma estratégia sinérgica da Engenharia de Tecidos (adaptado de OVSIANIKOV *et al.*, 2018).

Em adição, para considerar uma mimetização fidedigna do tecido ósseo, há a necessidade de estratégias que considerem também a porção vascular deste tecido, justamente para aumentar as chances de sucesso do construído uma vez *in vivo* (NG *et al.*, 2017). Portanto, nos tópicos a seguir, serão discutidas algumas estratégias na Engenharia de Tecidos para a induzir o processo de vascularização e para a biofabricação de vasos sanguíneos.

1.7 ABORDAGENS EM ENGENHARIA DE TECIDOS PARA INDUÇÃO DO PROCESSO DE VASCULARIZAÇÃO

Como descrito anteriormente, o desenvolvimento de modelos *in vitro* para vascularização é largamente explorado e atualmente, as principais estratégias (Fig. 20) são baseadas no uso de fatores de crescimento, enxertos vasculares,

co-cultivo em cultivo 2D ou 3D e no desenvolvimento de arcabouços (NOVOSEL *et al.*, 2011). Além disso, com o avanço das técnicas baseadas em bioimpressão 3D, alguns trabalhos já exploram o desenvolvimento de construídos mais complexos, principalmente focando em estratégias de pré-vascularização para implantes. Nesse tópico, serão descritas algumas dessas estratégias principais com resultados obtidos na literatura da área.

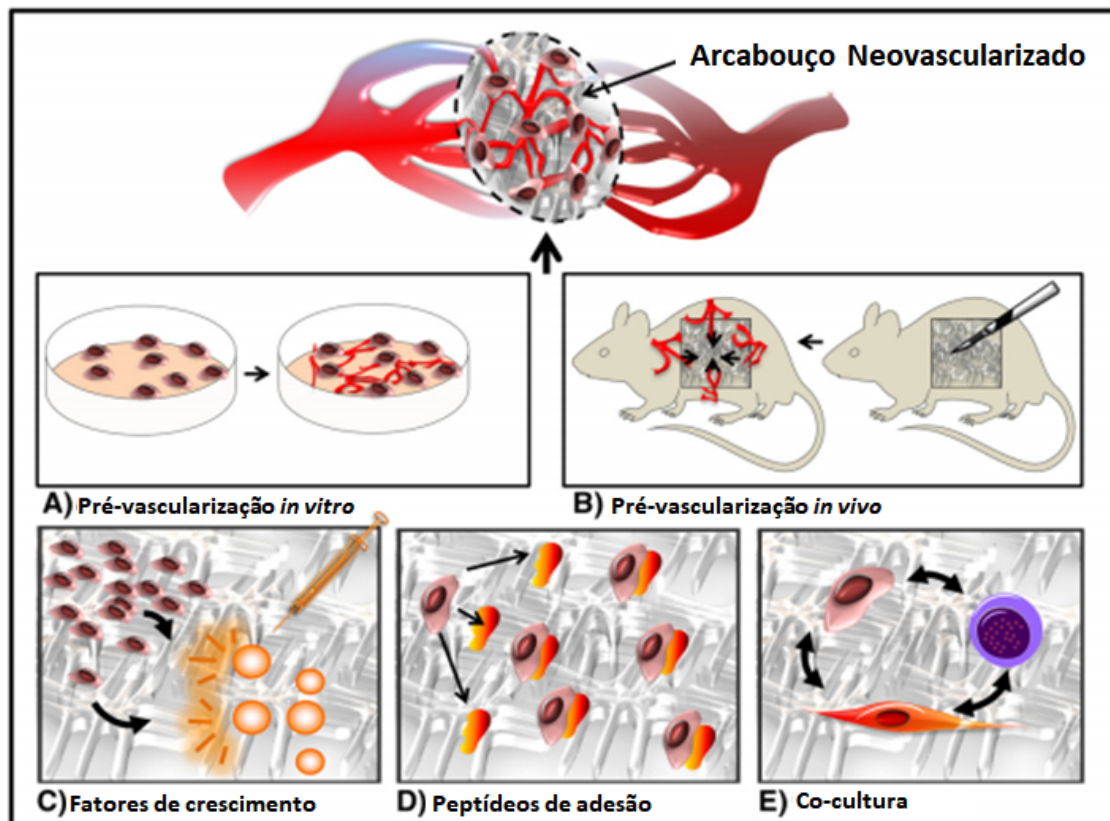


Figura 20: Estratégias em Engenharia de Tecidos para estimular o processo de angiogênese. (A, B) Pré-vascularização *in vitro* e *in vivo*. (C) Uso de fatores de crescimento endoteliais. (D) Uso de proteínas de adesão para funcionalizar arcabouços. (E) Co-cultivo de tipos celulares diferentes (adaptado de NOVOSEL *et al.*, 2011).

1.7.1 Fatores de crescimento

As abordagens na área de Engenharia de Tecidos para tecidos vasculares apresentam como um dos principais objetivos a restauração da circulação no local do implante de forma funcional. No entanto, a vascularização lenta ou insuficiente de enxertos é um dos principais fatores limitantes durante a sua implementação na clínica (SCHERBERICH *et al.*, 2010). De fato, enquanto

enxertos de tecido de tamanho clínico podem ser fabricados *in vitro* com sucesso, como por meio da cultura de progenitores autólogos em biomateriais apropriados, após a implantação *in vivo* no local do defeito, a difusão limitada de oxigênio e nutrientes permitem a diferenciação de apenas camadas externas do enxerto. Dessa forma, na ausência de estratégias para fornecer crescimento vascular interno, enxertos maiores iniciam o processo de necrose nas regiões centrais e não conseguem desempenhar seu papel morfofuncional da forma esperada (JOHNSON *et al.*, 2007; ROUWKEMA *et al.*, 2008).

Nesse contexto, uma das estratégias que está sendo explorada para tentar resolver essa limitação é a funcionalização dos arcabouços com fatores de crescimento chave para desencadear o processo de angiogênese *in vivo* (MARTINO *et al.*, 2015). A maioria dos fatores de crescimento apresentam a habilidade de interagir com sítios específicos da matriz extracelular e como os arcabouços mimetizam propriedades físico-químicas específicas da matriz extracelular de um tecido de interesse, eles podem ser funcionalizados com fatores de crescimento para promover o processo de angiogênese *in vivo* (SCHONHERR E HAUSSER, 2000; SCHULTZ E WYSOCKI, 2009). Na verdade, a primeira interação dos fatores de crescimento é com a matriz extracelular do que com os receptores das células presentes no microambiente.

Uma vez ligados ao arcabouço, os fatores angiogênicos (como por exemplo, VEGF, FGF, TGF- β e PDGF) são liberados, dependendo de sua afinidade de ligação e da ação de proteases que clivam especificamente áreas da matriz extracelular, ou dos domínios de ligação da matriz extracelular dos fatores de crescimento (MARTINO *et al.*, 2013, 2014). Consequentemente, a matriz extracelular libera moléculas de sinalização em diferentes cinéticas e de diferentes locais, o que permite uma regulação espaço-temporal bem controlada do processo de angiogênese (HYNES, 2009; SCHULTZ e WYSOCKI, 2009).

Outra estratégia explorada na literatura corresponde a entrega de múltiplos fatores de crescimento no local do implante e isso é interessante quando se almeja regenerar um tecido, como é o caso do tecido ósseo, em que fatores de crescimento associados a via de diferenciação osteogênica são importantes para estimular o início desse processo *in vivo*. Além disso, o uso de mais de um tipo de fator de crescimento endotelial liberados em tempos diferentes também já foi investigado e resultados mostraram que há uma

melhora no processo de vascularização, quando comparado com a entrega em um mesmo momento dos diferentes fatores de crescimento endoteliais, como observado no estudo realizado por TENGOOD e colaboradores (2010).

1.7.2 Desenvolvimento de arcabouços biomiméticos e a influência de suas topografias

Outra estratégia explorada na área de Engenharia de Tecidos para induzir o processo de angiogênese é o desenvolvimento de arcabouços biomiméticos, com propriedades biocompatíveis e funcionais para induzir uma resposta a nível molecular no microambiente tecidual após o implante. No caso, durante o desenvolvimento de arcabouços biomiméticos, a topografia dos arcabouços pode influenciar de forma significativa o processo de vascularização. Essa estratégia já é realizada há algum tempo na área (MOON e WEST, 2008) e o avanço das tecnologias de fabricação permitiu o aprimoramento dos arcabouços.

Os arcabouços biomiméticos fabricados de forma sintética para abordagens de vascularização são frequentemente compostos por hidrogéis, os quais são produzidos a partir de biopolímeros ou polímeros sintéticos. Os polímeros de origem natural, como colágeno, gelatina e ácido hialurônico apresentam vantagens principalmente em relação à biocompatibilidade. Além disso, essas moléculas fornecem superfícies para adesão celular e são biodegradáveis. No entanto, o processo de modificação de hidrogéis para sua funcionalização não é considerado trivial, por apresentar o risco de não ser reprodutível (LUTOLF *et al.*, 2005; KHETANI e BHATIA, 2006; NOVOSEL *et al.*, 2011). Dessa forma, os polímeros sintéticos estão sendo considerados em mais estratégias do que quando comparado com o uso de hidrogéis naturais. Além disso, propriedades como elasticidade e biodegradabilidade são fáceis de adaptar em arcabouços poliméricos, os quais por sua vez podem ser reproduzidos com qualidade consistente (LUTOLF *et al.*, 2003; UIJIN *et al.*, 2007).

No caso do desenvolvimento de arcabouços biomiméticos para aprimorar a angiogênese, a funcionalização dos arcabouços com fatores de crescimento para induzir este processo é largamente utilizada. Muitos estudos utilizam principalmente o VEGF incorporado em arcabouços poliméricos, como PLGA e

PCL. Além disso, o uso da fibrina e do Matrigel™ como hidrogéis associados com células endoteliais para induzir o processo de *sprouting in vitro* é muito explorado (SERBO e GERECHT, 2013; WAGNER *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2018).

Além da funcionalização de arcabouços, a topografia é capaz de influenciar a proliferação de células endoteliais e o processo de angiogênese. O tamanho dos poros em arcabouços poliméricos ou em hidrogéis é um exemplo. No estudo realizado por FU e colaboradores (2017), foi observada uma melhora no crescimento de células endoteliais progenitoras, tanto *in vitro* como *in vivo*, em hidrogéis de gelatina, a partir da manipulação do tamanho dos poros do hidrogel. Os resultados mostraram que o tamanho do poro médio suportou a melhor diferenciação das células endoteliais e, portanto, a melhor vascularização no hidrogel *in vitro*. Porém, a vascularização *in vivo* foi melhor promovida em hidrogéis com poros de maior tamanho devido ao aumento da invasão do tecido vascular.

Além disso, muitos estudos também têm mostrado que a adição de canais em um arcabouço poroso é capaz de promover um melhor crescimento celular e uma vascularização mais rápida, levando a melhores resultados na formação de novos tecidos. O motivo dessa outra mudança de topografia é porque os arcabouços de maior tamanho carecem de redes de canais perfusáveis e prejudicam a sobrevivência das células endoteliais individualizadas ou de co-cultivo e como consequência, o desenvolvimento da função do novo tecido após o implante (KANG *et al.*, 2018).

1.7.3 Estratégias de pré-vascularização de construídos em Engenharia de Tecidos

Uma das principais desvantagens de abordagens de vascularização de implantes na área de Engenharia de Tecidos é o tempo necessário para que os vasos do hospedeiro atinjam as áreas mais internas dos construídos. Embora esse processo possa ser acelerado com o uso de fatores de crescimento, como discutido previamente, a formação de vasos sanguíneos envolve um conjunto complexo de interações célula-célula e estabilização, um processo considerado relativamente lento (UTZINGER *et al.*, 2015). Essa limitação desencadeou o surgimento de estratégias de pré-vascularização *in vitro* para resolução desse

problema. O conceito das abordagens de pré-vascularização é estabelecer a pré-formação da microvasculatura dentro de um construído, para que o processo de anastomose possa ocorrer (BEIER *et al.*, 2010; LASCHKE *et al.*, 2011). Nesse contexto, algumas estratégias de pré-vascularização serão discutidas a seguir.

Os principais estudos para promover a pré-vascularização *in vitro* são baseados em estratégias de co-cultivo ou até mesmo tri-cultivo de células em 2D ou 3D e na utilização de arcabouços biomiméticos com esses tipos de cultivo. Um dos objetivos, por exemplo, é explorar se os tipos celulares são capazes de prover suporte para as células endoteliais realizarem suas funções de formação de microvasos nos biomateriais. No trabalho realizado por VERSEIJDEN e colaboradores (2010), os autores investigaram se ASCs, em comparação com as bmMSCs, poderiam prover suporte para as células endoteliais formarem microvasos *in vitro*. Para isso, os autores cultivaram HUVECs, ASCs e bmMSCs em suspensão ou em co-cultivo de esferoides embebidos em fibrina. Os autores descobriram que tanto as bmMSCs, como as ASCs promoveram suporte e organização para as HUVECs em estruturas microvasculares quando co-cultivadas.

LLOYD-GRIFFITH e colaboradores (2015) investigaram se uma co-cultura de células-tronco derivadas do líquido amniótico e HUVECs poderia ser utilizada para formação de uma vasculatura *in vitro* em um arcabouço de sulfato de condroitina de colágeno. Os resultados deste estudo demonstram, pela primeira vez, que esse tipo de co-cultivo foi capaz de pré-vascularizar os arcabouços em 7 dias e que as células-tronco derivadas do líquido amniótico se comportaram como pericitos para formar microvasos.

YAO e colaboradores (2020) desenvolveram um arcabouço polimérico em formato de hexágonos ou “*honeycomb*” (*do inglês*, colmeia de abelha) para comparar a capacidade de formação de microvasos por HUVECs em co-cultivo com MSCs. O uso de arcabouços poliméricos com esse tipo de geometria está sendo muito utilizado para estudos de vascularização, justamente porque mimetiza eventos iniciais de formação de redes vasculares. Os resultados mostraram que o arcabouço foi capaz de suportar o crescimento endotelial e a formação de estruturas semelhantes a tubos vasculares *in vitro*.

HEO e colaboradores (2019) exploraram o co-cultivo em uma abordagem “*scaffold-free*”, a partir do uso dos esferoides. Para o co-cultivo, os autores

produziram esferoides de MSCs e HUVECs e os cultivaram em hidrogel de fibrina para avaliar sua capacidade de formar microvasos *in vitro*. Os esferoides foram capazes de se proliferar e formar uma rede vascular, se tornando uma opção para serem utilizados na pré-vascularização de arcabouços e implante *in vivo* de regeneração.

Por fim, como o número de estudos com cultivo 3D está aumentando consideravelmente nos últimos anos, o uso dessa estratégia para aplicações de pré-vascularização a partir de co-cultivo não é diferente. Dessa forma, esferoides vasculares podem ser utilizados tanto como blocos de construção para promover a formação de tecidos de maior calibre e como unidades de pré-vascularização e otimizar o processo de angiogênese *in vivo* (Fig. 21).

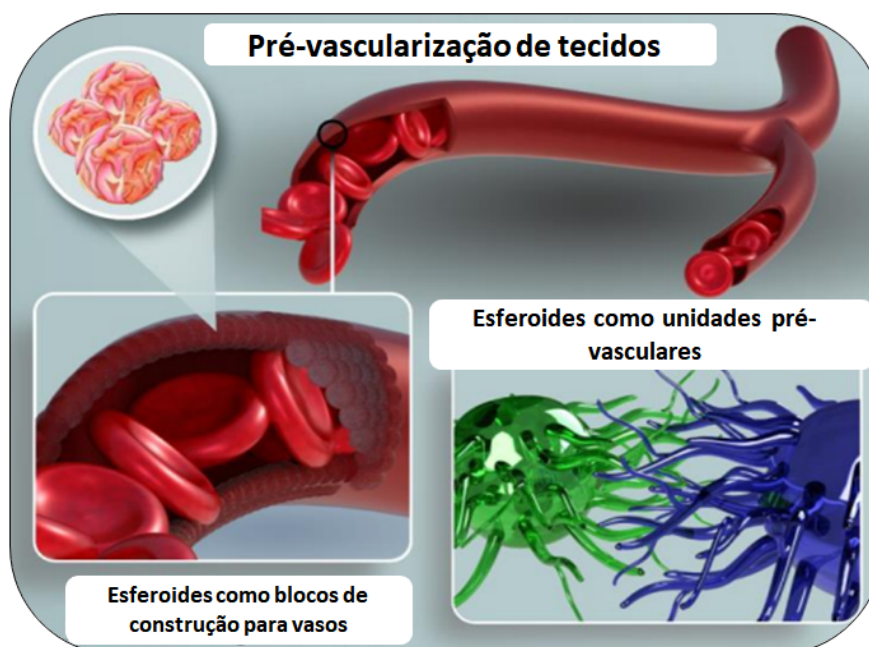


Figura 21: Esferoides vasculares como unidades de pré-vascularização e como blocos de construção para abordagens em Engenharia de Tecidos. Os esferoides vasculares produzidos a partir de co-cultivo podem ser utilizados como blocos de construção para a biofabricação de vasos sanguíneos. Além disso, os esferoides vasculares podem ser utilizados para formar uma rede pré-vascular a partir do processo de brotamento (adaptado de BURDIS e KELLY, 2021).

1.7.4 Estratégias em biofabricação para vascularização

Com o progresso da tecnologia, as estratégias em biofabricação estão ganhando destaque no desenvolvimento de estruturas vasculares. Atualmente, dentre elas, a bioimpressão 3D é considerada a principal para a fabricação *in*

vitro de construídos teciduais baseados em arcabouços poliméricos ou hidrogéis hierarquicamente mais complexos.

A bioimpressão se tornou uma ferramenta promissora para a fabricação de construídos teciduais vascularizados. A partir da figura 22, é possível observar como a resolução de cada técnica de bioimpressão 3D pode contribuir para a formação de estruturas vasculares específicas, visto que cada técnica apresenta suas limitações. Para este processo de fabricação, o desenvolvimento da biotinta com propriedades físico-químicas ideais ainda é um desafio (RICHARDS *et al.*, 2017). Exemplos de biotintas com propriedades biofísicas adequadas para o melhor desempenho de processos vasculares são hidrogéis a base de fibrina (WANG *et al.*, 2018; FREEMAN *et al.*, 2019), alginato (JIA *et al.*, 2014) e de gelatina metacrilada (GelMA) (BERTASSONI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017). Além disso, a integração do tempo no processo de bioimpressão, conhecido como bioimpressão 4D produz alterações estruturais nos construídos teciduais em resposta a estímulos externos, o que pode ser interessante devido a possibilidade de gerar uma biofabricação mais realista dos capilares sanguíneos (DATA *et al.*, 2017).

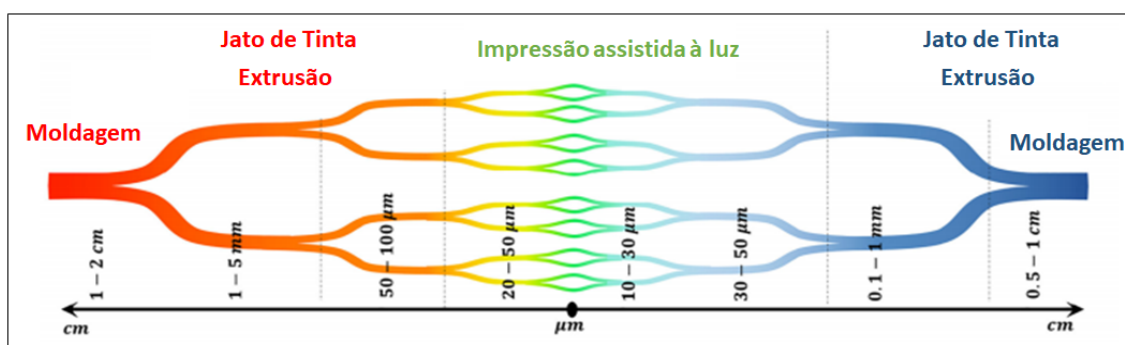


Figura 22: Hierarquia por tamanho dos vasos sanguíneos (das artérias às veias) de acordo com as técnicas de biofabricação atuais. A partir das técnicas de bioimpressão 3D é possível produzir tecidos vasculares biomiméticos de acordo com seu tamanho. Pela técnica de jato de tinta e extrusão, é possível produzir estruturas de vasos com diâmetros que variam de 100μm até 2cm, enquanto que a partir da técnica assistida por laser, estruturas vasculares de menor calibre, entre 10 a 50μm podem ser produzidas (adaptado de MIRI *et al.*, 2018).

Uma das abordagens que está sendo utilizada é a bioimpressão de biotintas de sacrifício, principalmente pelo método de extrusão. Esses hidrogéis são sensíveis a temperatura biológica e uma vez degradados, irão resultar em canais perfusáveis. Os hidrogéis podem ser carregados com células ou fatores

solúveis, os quais irão ficar retidos no outro tipo de biomaterial circundante aos canais. O biomaterial circundante pode ser constituído a base de polímeros ou inclusive de qualquer outro tipo de hidrogel que não seja sensível a degradação em temperatura biológica, como a fibrina (MIRI *et al.*, 2019).

No trabalho realizado por LEE e colaboradores (2014) foi utilizada a técnica de extrusão para biofabricação de canais vasculares perfusáveis de maior diâmetro e criar uma rede capilar adjacente, via indução do processo de angiogênese, para se conectar nesses canais. No construído, foi utilizada a agarose como biotinta de sacrifício, justamente para formar os canais perfusáveis de maior diâmetro e a fibrina foi utilizada para circundar esses canais com os componentes celulares e induzir o processo de angiogênese. Todos esses componentes foram bioimpressos em um substrato de colágeno (Fig. 23).



Figura 23: Exemplo de abordagem para biofabricação de uma rede vascular a partir da técnica de bioimpressão 3D por extrusão. Inicialmente, foi impressa uma camada de colágeno como substrato. Em seguida, a gelatina foi impressa nas laterais para formar um canal e por fim, foi feita a extrusão da biotinta contendo fibrina e os componentes celulares endoteliais (adaptado de LEE *et al.*, 2014).

No trabalho realizado por JI e colaboradores (2019), os autores desenvolveram uma nova abordagem de bioimpressão que permitiu a impressão de uma biotinta de sacrifício, no caso a plurônica, dentro de hidrogéis fotocuráveis comumente utilizados. No estudo, o hidrogel fotocurável com células endoteliais foi bioimpresso camada por camada a partir de extrusão e cada camada foi exposta a luz UV para criar camadas parcialmente reticuladas. Após atingir uma espessura desejada, o hidrogel de sacrifício foi bioimpresso diretamente dentro desta camada parcialmente curada. A camada foi então exposta à luz para confinar e apoiar o hidrogel de sacrifício. Por fim, após a reticulação total do sistema, o hidrogel de sacrifício foi lavado, formando um canal perfusável (Fig. 24).

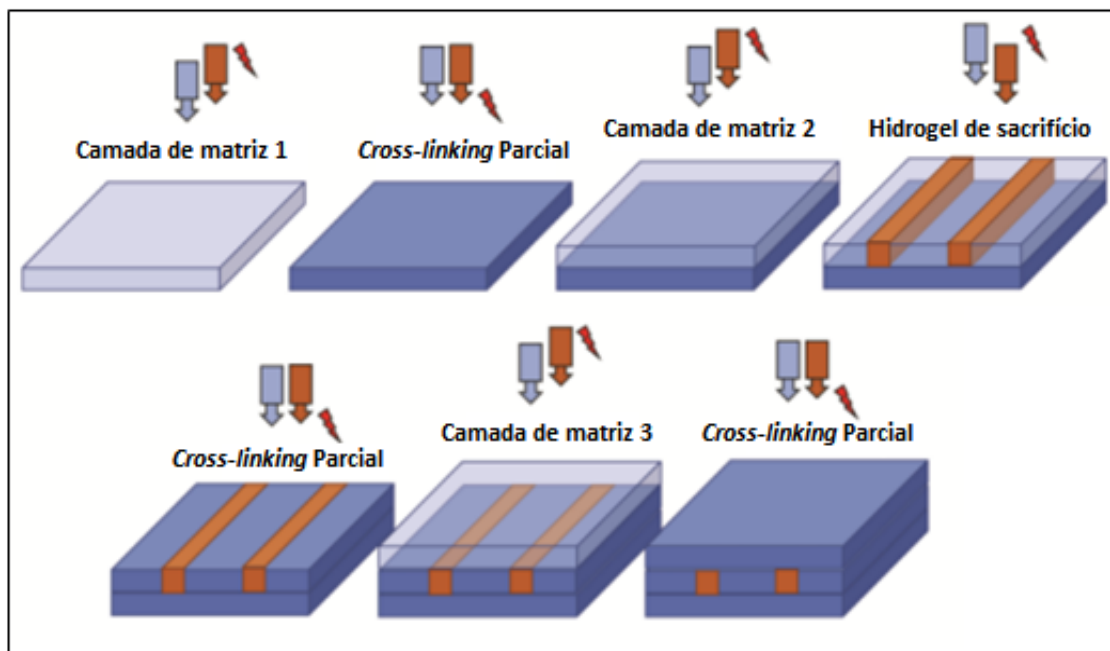


Figura 24: Exemplo de estratégia de bioimpressão 3D sequencial para criação de canais vasculares a partir de uma biotinta de sacrifício e de hidrogéis fotocuráveis. Inicialmente, uma camada de hidrogel fotocurável é extrudada no substrato, ocorre a reticulação a partir de exposição à UV e outra camada de hidrogel é extrudada em seguida. Por fim, é feita a extrusão da biotinta de sacrifício para criar os canais. Esse processo é repetido, até atingir o número de camadas desejado (adaptado de SHEN *et al.*, 2019).

Dessa forma, a partir dos estudos apresentados neste tópico, é possível observar que houve uma evolução nas abordagens de biofabricação de vasos sanguíneos ao longo do tempo. Tal evolução foi possível, principalmente, devido aos avanços da tecnologia de bioimpressão 3D e de novas formulações de biotintas disponíveis no mercado. Com o aumento da complexidade dos construídos, o número de artigos que investigaram a combinação de estratégias de vascularização e biofabricação de tecido ósseo em Engenharia de Tecidos aumentou, como será discutido no tópico a seguir.

1.8 ESTRATÉGIAS DE VASCULARIZAÇÃO PARA A ENGENHARIA ÓSSEA

É sabido que o tecido ósseo apresenta a capacidade de se regenerar espontaneamente em lesões não críticas. No entanto, em lesões críticas, onde há a necessidade de intervenção médica, o tecido ósseo não é capaz de se regenerar, como é o caso de lesões conhecidas como “não unidas”, as quais

podem levar a defeitos ósseos persistentes após um longo prazo. Nesse contexto, estratégias terapêuticas já conhecidas na prática para regeneração óssea envolvem principalmente o uso de enxertos autólogos, homólogos ou xenólogos. Porém, as limitações das aplicações clínicas disponíveis desses enxertos limitam o sucesso terapêutico e são causadas normalmente pela morbidade do local do doador, deficiência óssea autógena em autoenxertos, riscos de infecção e rejeição do sistema imune. Dessa forma, é interessante o desenvolvimento de abordagens em Engenharia de Tecidos para a regeneração óssea (SHI *et al.*, 2018; RODDY *et al.*, 2018).

Ao longo dos anos, diversos trabalhos foram publicados nessa área, principalmente a partir do uso de arcabouços biomiméticos e fatores de crescimento osteoindutores. Porém, como o tecido ósseo é altamente vascularizado, há a necessidade de estratégias que considerem também a porção vascular do tecido ósseo (NG *et al.*, 2017). Nesse tópico, serão descritas algumas estratégias de vascularização focadas para a engenharia óssea.

A maioria dos artigos publicados até o momento exploraram o uso de arcabouços e fatores de crescimento endoteliais e/ou osteoindutores. Em combinação com os arcabouços, a principal fonte de células utilizada é o co-cultivo entre osteoblastos ou MSCs e células endoteliais, como as HUVECs. Esse tipo de estratégia já é realizado há mais de uma década, como pode ser exemplificado pelo trabalho de SANTOS e colaboradores (2009), onde os autores desenvolveram um construído a partir do co-cultivo de osteoblastos com células endoteliais da derme em um arcabouço polimérico de policaprolactona. Quando comparado com os tipos celulares em cultivo em monocamada, o construído baseado na co-cultura apresentou uma maior expressão de genes envolvidos com o processo de osteogênese, além de uma maior secreção de VEGF.

Mais recentemente, CUI e colaboradores (2016) utilizaram a impressão 3D para o desenvolvimento de um arcabouço polimérico contendo camadas de BMP-2 e VEGF. Na superfície deste biomaterial impresso em 3D, foi realizada a semeadura da suspensão de células de MSCs e HUVECs e o construído foi mantido por 4 semanas em sistema dinâmico. Os resultados mostraram que quando comparado com as condições controle, o construído desenvolvido

produziu uma rede vascular *in vitro*, além de produzir uma maior quantidade de fosfatase alcalina e colágeno.

WANG e colaboradores (2018) também exploraram a funcionalização de arcabouços poliméricos a partir da combinação de fatores de crescimento vasculares e osteogênicos. No estudo foi utilizado o VEGF e o BMP-2 em um arcabouço polimérico revestido com nanohidroxiapatita. Nesse arcabouço, foram semeadas células de linhagem pré-osteoblásticas, a MC3T3-E1. Os principais resultados mostraram que ambos os fatores de indução foram sendo constitutivamente liberados a partir do arcabouço polimérico e que a estratégia de utilizar esse tipo de construído aprimorou o processo de diferenciação osteogênico pelas células, o que foi evidenciado por análises de expressão de genes tipicamente envolvidos nesta via de diferenciação, pela produção de proteínas de matriz extracelular e deposição de cálcio extracelular.

LI e colaboradores (2019) utilizaram um sistema de co-cultivo entre MSCs e células endoteliais para povoar um arcabouço polimérico biomimético contendo revestimento de hidroxiapatita. Inicialmente, os resultados das análises *in vitro* mostraram que o construído apresentou uma alta expressão de genes envolvidos com a via de diferenciação osteogênica, como fosfatase alcalina, osteocalcina e RUNX-2, assim como de fatores de transcrição envolvidos no processo de angiogênese, como o CD31. Uma vez *in vivo*, os autores observaram formação de tecido ósseo novo em um modelo de defeito ósseo crítico femoral em ratos e acredita-se que a regeneração foi otimizada justamente pelos resultados encontrados *in vitro*.

Atualmente, a produção de esferoides vasculares a partir do co-cultivo, principalmente entre MSCs e HUVECs como estratégia de vascularização está ganhando espaço na literatura. Recentemente, HEO e colaboradores (2020), utilizaram a técnica de bioimpressão assistida para biofabricar esferoides de co-cultivo entre MSCs e HUVECs em geometrias complexas pré-definidas. Esses blocos de construção foram em seguida induzidos para a via osteogênica e apresentaram uma alta expressão de fatores de transcrição osteogênicos e vasculares, abrindo uma possibilidade para a biofabricação de construídos a partir de esferoides sem o uso de arcabouços poliméricos.

No entanto, a combinação de esferoides vasculares e esferoides como um modelo para mimetizar o tecido ósseo ainda foram pouco explorados na

literatura. Idealmente, a combinação desses microtecidos poderia favorecer o processo de regeneração de lesões ósseas críticas *in vivo* (Fig. 25).

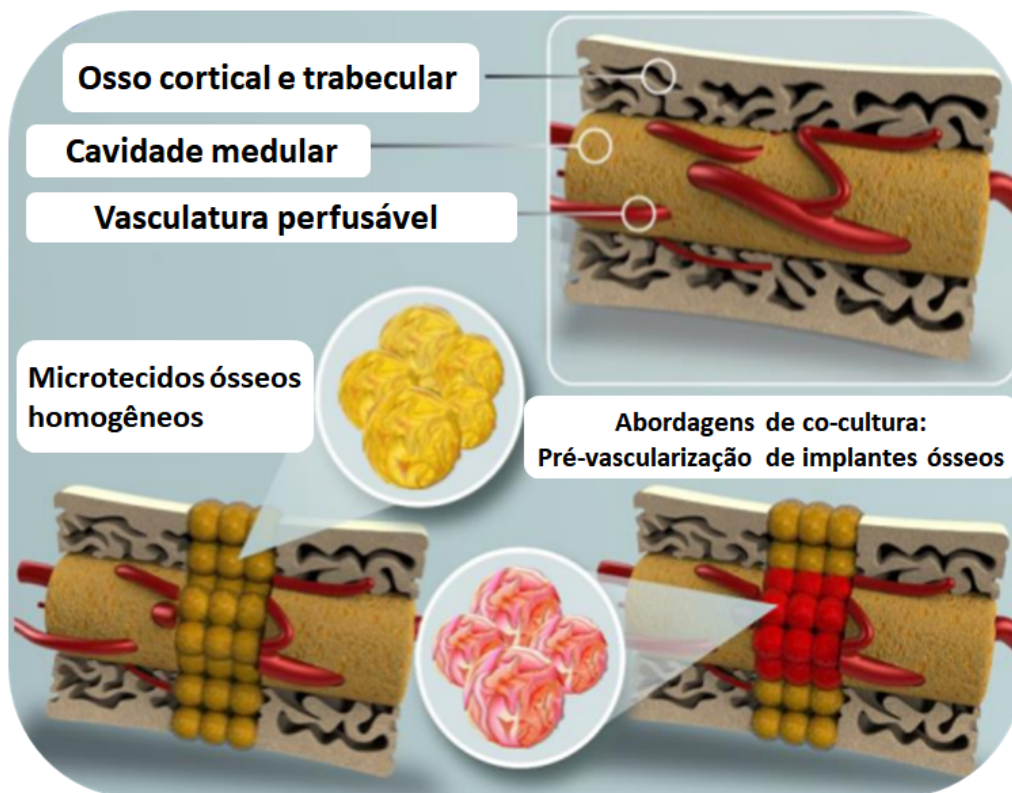


Figura 25: Representação esquemática de como os esferoides vasculares podem ser utilizados na engenharia de tecido ósseo. Esferoides precursores ou induzidos para a hipertrofia a partir de MSCs podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com esferoides vasculares, produzidos a partir de co-cultivo, para aplicações em defeitos ósseos críticos (adaptado de BURDIS e KELLY, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

A Engenharia Tecidual é uma área que confere grandes promessas para promover a substituição de tecidos lesionados por traumas, doenças ou senectude (TAN *et al.*, 2014). É sabido que o número de habitantes de terceira idade e em senectude aumentará consideravelmente nos próximos anos (IBGE, 2018). Além disso, as populações de jovens que vivem em metrópoles estão mais expostas a lesões traumáticas. Nesse contexto, há a necessidade de promover uma maior qualidade de vida para a população.

O tecido ósseo é um exemplo de alvo de estudo na área de medicina regenerativa, devido a lesões como osteoporose e osteoartrite que estão diretamente relacionadas com o aumento da expectativa de vida populacional e que geram elevados custos para o sistema público de saúde (SUS) (PINHEIRO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013). No Brasil, uma pesquisa constatou que o gasto do SUS para o tratamento de osteoporose em idosos é de aproximadamente R\$ 290 milhões de reais, no período de dois anos (MORAES *et al.*, 2014). Além disso, lesões ósseas críticas não unidas causadas por traumas ou acidentes são um desafio recorrente na rotina clínica. Nesse tipo de lesão, o tecido ósseo não é capaz de se regenerar sozinho e há a necessidade de intervenção médica.

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas na área de Engenharia Tecidual como tentativa de promover a regeneração ou substituição do tecido ósseo lesionado. Uma delas é a utilização de biomateriais como arcabouços 3D, combinados com MSCs. Os biomateriais devem seguir diferentes critérios para serem utilizados com sucesso, como serem biocompatíveis e bioabsorvíveis (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015). Para promover uma regeneração a longo prazo, fatores de crescimento começaram a ser combinados com MSCs para serem transplantados com os biomateriais, porém, não se sabe claramente como essas moléculas agem no local da lesão para causar o reparo do tecido injuriado (HAYRAPETYAN *et al.*, 2015).

A utilização de esferoides formados a partir de células representa uma abordagem interessante para a área de medicina regenerativa, pois apresentam capacidade de fusão, podem apresentar uma composição complexa, podem ser pré-vascularizados e podem ser biofabricados automaticamente por robotização (REZENDE *et al.*, 2013). Devido a propriedade de fusão, os esferoides tornam-

se aptos para serem utilizados em protocolos de bioimpressão 3D (MIRONOV *et al.*, 2011) e como durante o processo de fusão, ocorre a mimetização de eventos do período embrionário, torna-se um modelo interessante de diferenciação para ser explorado *in vitro*. É importante ressaltar ainda que as tecnologias de biofabricação representam estratégias inovadoras em território nacional.

Um outro desafio relacionado diretamente à engenharia óssea é a vascularização, principalmente para promover a regeneração de defeitos ósseos críticos (DALY *et al.*, 2017). Um dos motivos é que uma vez alcançada a área do defeito crítico, os nutrientes não podem mais depender somente do processo de difusão para sustentar as células do microambiente. É sabido que uma vez *in vitro*, o uso de biorreatores pode ajudar a superar muitos desses problemas de aumento de escala de construídos, justamente por promoverem uma melhor perfusão de gases e nutrientes. No entanto, se esses tecidos forem implantados no organismo, atualmente acredita-se que o desenvolvimento de uma rede vascular perfusável seja o caminho para o sucesso clínico (NULTY, 2020).

Na literatura, as principais estratégias exploradas em Engenharia de Tecidos para o desenvolvimento de construídos com a porção vascular são baseadas no uso de fatores de crescimento endoteliais, enxertos vasculares, co-cultivo e no desenvolvimento de arcabouços (MERCADO-PAGÁN, 2015). No entanto, o uso de modelos 3D a partir de esferoides, sua associação com biomateriais para a fabricação de construídos mais complexos e o uso da bioimpressão 3D, foram pouco investigados na literatura atual.

A partir do contexto apresentado, neste trabalho, serão utilizadas células-tronco/estromais mesenquimais humanas em um cultivo tridimensional de esferoides utilizando a técnica de hidrogel de agarose micromoldado para biofabricação de tecido ósseo. Em seguida, os esferoides biofabricados serão combinados com arcabouços 3D impressos (BAPTISTA, KRONEMBERGER *et al.*, 2018) como uma nova abordagem para o tratamento de lesões ósseas críticas em modelos pré-clínicos, considerando também a porção vascular desse tecido.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver um construído engenheirado com características morfo-funcionais similares ao tecido ósseo, a partir da associação de esferoides com arcabouços poliméricos 3D impressos, para promover a regeneração de defeitos ósseos críticos.

3.2 ESPECÍFICOS: PARTE A

- Produzir esferoides induzidos para a via hipertrófica com homogeneidade de tamanho e forma como uma abordagem para o reparo ósseo.
- Investigar a eficácia da diferenciação dos esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia a partir de análises funcionais.
- Avaliar morfologicamente o processo de fusão de esferoides de ASCs no seu estado indiferenciado e diferenciado para a via osteogênica, a fim de otimizar o modelo de indução osteogênica *in vitro*.
- Analisar a eficácia de diferenciação dos esferoides de ASCs fusionados a partir da detecção de depósitos de cálcio extracelular e moléculas de matriz extracelular.
- Associar esferoides de ASCs não induzidos e induzidos para a via hipertrófica ao arcabouço 3D impresso de poli (ácido láctico) /carbonato apatita (PLA/CHA) *in vitro* como uma estratégia em engenharia óssea.
- Comparar a eficácia de adesão, morfologia e eventos de migração celular dos esferoides não induzidos e induzidos de ASCs a hipertrofia após serem semeados em arcabouços de PLA/CHA com diferentes configurações de estrutura e espaçamento.

- Realizar ensaios *in vivo* para avaliar a capacidade de regeneração tecidual e produção de osso autógeno em modelo de calvária de ratos, fazendo uso de esferoides de ASCs associados ao arcabouço 3D impresso de PLA/CHA.
- Comparar a quantidade de tecido ósseo neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo nos grupos de construídos experimentais implantados em defeito ósseo crítico de calvária em ratos.

3.3 ESPECÍFICOS: PARTE B

- Produzir esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia que apresentem homogeneidade de tamanho e forma.
- Analisar a eficácia de diferenciação dos esferoides induzidos a hipertrofia a partir de análises histológicas e de bioquímica.
- Investigar o comportamento de fusão dos esferoides induzidos a hipertrofia.
- Fabricar esferoides vasculares a partir do co-cultivo entre bmMSCs e HUVECs e investigar sua funcionalidade *in vitro* a partir da comparação de diferentes proporções de células.
- Investigar o comportamento morfológico e funcional dos esferoides vasculares semeados em diferentes densidades em biotinta de fibrina.
- Realizar a impressão 3D de arcabouços de PCL para estudos *in vitro*, defeitos subcutâneo e femoral *in vivo*.
- Investigar o comportamento morfofuncional de esferoides hipertróficos e vasculares semeados em arcabouço de PCL 3D impresso em sistema dinâmico de bioreator.
- Realizar a bioimpressão 3D de esferoides vasculares e analisar suas propriedades de tamanho e forma, morfológicas e de viabilidade celular.
- Implantar os grupos de construídos fabricados a partir dos esferoides hipertróficos e/ou vasculares semeados no arcabouço 3D impresso de PCL em implante subcutâneo em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS: PARTE A

4.1 EXPANSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO EM SISTEMA DE CULTIVO BIDIMENSIONAL

As amostras de lipoaspirado subcutâneo foram coletadas de doadores do sexo feminino que possuem entre 18 a 55 anos de idade, saudáveis, não obesos ou com histórico anterior de obesidade (SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2017), de acordo com os procedimentos já aprovados pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (Protocolo de pesquisa 25818719.4.0000.5257, anexo I). As ASCs utilizadas no presente trabalho foram previamente criopreservadas conforme descrito (Baptista *et al.*, 2009). As ASCs criopreservadas em primeira passagem foram descongeladas a 37°C e lavadas com dimetilsulfóxido (DMSO) por centrifugação. As células foram plaqueadas em frascos de cultura de tecidos e mantidas com TheraPEAK™ MSCGM-CD™, meio de cultivo de células-tronco mesenquimais, quimicamente definidas (Lonza, São Paulo, Brasil) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Ao atingir 90% de confluência, a monocamada de células foi dissociada com solução de 0,125% de tripsina (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA) e ácido etilenodiaminotetracético 0,78 mM (EDTA, Invitrogen, São Paulo, Brasil) e re-plaqueadas para nova expansão em monocamada de células.

4.2 FABRICAÇÃO DO HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO

Os esferoides foram fabricados em sistema de hidrogel de agarose micromoldado. Para produção deste hidrogel micromoldado, foi utilizado um molde de silicone (MicroTissues® 3D Petri Dish®, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) contendo 81 projeções (Fig. 26A), com diâmetro de 800 µm cada.

Em seguida, 1 g de agarose ultrapura (Invitrogen) foi pesada com o auxílio de uma balança analítica e esterilizada por autoclavagem (mesmo período e temperatura citados anteriormente). Concomitantemente, a solução salina de 0,9% NaCl foi preparada e esterilizada para diluição de agarose em uma solução estéril. Para que fosse possível homogeneizar completamente a solução de

agarose ultrapura, esta foi aquecida em micro-ondas em ciclos de 10 segundos até a solução ficar transparente.

Após a diluição completa da agarose, foi dispensado um volume de 550 μL da solução de agarose 2% aquecida, no centro de cada molde de silicone. Em seguida, a agarose foi desenformada (Fig. 26C) e dispensada em um poço de uma placa de 12 poços (Kasvi) (Fig. 26D). Após 15 minutos, foi adicionado 2mL de DMEM *low-glucose* para iniciar o procedimento de equilíbrio do hidrogel formado, que foi mantido por 15 minutos em estufa com 5% CO_2 a 37°C. Este processo foi repetido por duas vezes, sendo a última etapa do equilíbrio realizada com meio de cultivo descrito a seguir na tabela 1.

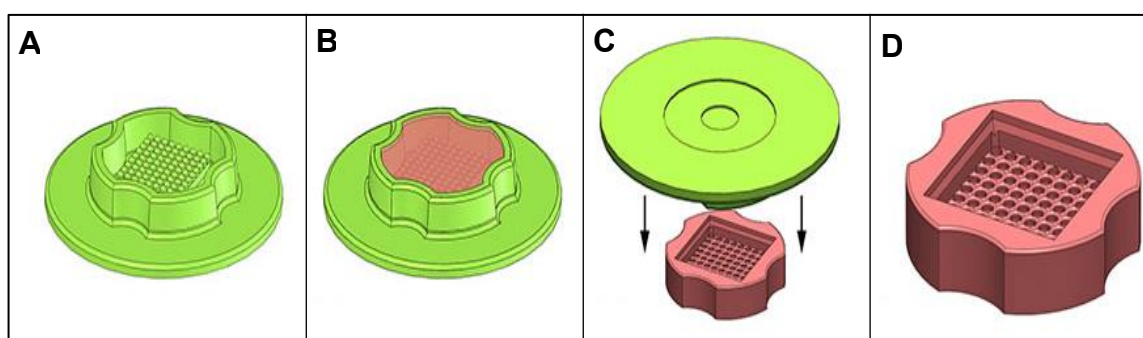


Figura 26: Molde de silicone MicroTissues® 3D Dish® (Sigma). Molde de silicone contendo 81 ressecções (A). Agarose ultrapura (em rósea) adicionada no centro do molde de silicone (B). Processo de retirada da agarose ultrapura solidificada do interior do molde de silicone (C). Hidrogel de agarose micromoldado formado (D) (Adaptado de <https://www.microtissues.com>).

4.3 CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE ASCs EM HIDROGEL DE AGAROSE MICROMOLDADO E INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Ao atingir a confluência de 90% em monocamada, ASCs em segunda passagem foram dissociadas das garrafas de cultura utilizando solução de tripsina 0,125% e 0,78 mM EDTA por 5 minutos. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, foi separado um total de 2×10^6 células em um tubo de polipropileno de 15 mL (Kasvi) para cada hidrogel micromoldado fabricado. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com 5 mL de solução PBS 0,01 M em agitação constante de 400 g por 5 minutos. Posteriormente, o *pellet* formado foi ressuspensão em 120 μL em meio de cultivo de manutenção do cultivo tridimensional (Tabela 1). Um volume total de 190 μL da suspensão celular foi

adicionado no interior do hidrogel de agarose micromoldada de forma constante evitando a formação de bolhas. Após um período de 40 minutos, tempo suficiente para que as células sedimentassem no interior das ressecções por ação da gravidade, foi adicionado um volume de 2 mL de meio de cultivo e os moldes foram colocados na estufa úmida com 5% CO₂ a 37°C por até 24 h.

Tabela 1: Componentes do meio de cultivo com suas respectivas concentrações.

Componentes do meio de cultivo	Concentração de uso
Ácido ascórbico	50µg/mL
ITS (100x)	1x
PS	1000mg/mL
Albumina	1,25µg/mL

PS: penicilina e estreptomicina.

ITS: Insulina, Transferrina e Selênio (Sigma).

Após 24 horas, período em que os esferoides concluíram o processo de compactação, foi iniciada a indução para a via osteogênica. Esferoides não induzidos pareados foram fabricados e mantidos em meio de cultivo sem nenhum fator de indução. Para a condição de indução, inicialmente foram utilizados os fatores de indução condrogênica, TGF-β3 10 ng/ml (Sigma) e Dexametasona 10⁻⁸ M (Sigma) durante 2 semanas, de modo que após esse período houve a troca do meio de cultura para os fatores de indução osteogênica, os quais foram o β-glicerofosfato 0,8 M (Sigma) e Dexametasona 10⁻⁷ M, durante 3 semanas, totalizando um período de 5 semanas de cultivo. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana, em uma diferença de 3 dias a cada troca.

4.4 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES DE ASCs

Para medição do diâmetro maior e menor dos esferoides, foram capturadas imagens digitais dos esferoides ao longo das semanas de cultivo,

com o auxílio do microscópio óptico invertido equipado com câmera digital (Leica DFC 500). Os diâmetros maior e menor dos esferoides não induzidos e induzidos foram determinados com auxílio do *software* AxioVision Rel. 4.6. Em seguida, foi calculada a média aritmética dos diâmetros dos esferoides e a fim de avaliar a homogeneidade de tamanho, foi feito o cálculo da razão entre os diâmetros menor e maior dos esferoides. É importante ressaltar que quanto mais próximo a 1 o valor da razão dos diâmetros, mais próximo ao formato de uma esfera estão os esferoides. As análises dos esferoides não induzidos e induzidos foram realizadas em 0 h, duas, três e cinco semanas, utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

4.5 COLETA DE SOBRENADANTE E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES SECRETADOS POR *MULTIPLEX*

A fim de avaliar a possível presença de mediadores secretados no sobrenadante dos esferoides não induzidos e induzidos para a via osteogênica individualizados, ao longo de duas, três e cinco semanas de cultivo, foram realizadas análises de *MULTIPLEX*. Essa análise também foi realizada para os esferoides de ASCs não induzidos para a via hipertrófica semeados no arcabouço de PLA/CHA após 1 e 2 semanas de cultivo.

Vinte e quatro horas antes da coleta do sobrenadante das culturas de esferoides das condições não induzidas e induzidas, foi realizada a troca do meio de indução pelo meio de cultivo sem nenhum fator indutor. Essa etapa foi realizada para não haver interferência na quantificação dos mediadores secretados, pela presença dos fatores de indução no meio de cultivo. Um volume de 1,5 mL de sobrenadante foi coletado e distribuído em tubos do tipo *ependorf*, cada um contendo 100 µL do sobrenadante coletado. Em seguida, os tubos foram armazenados a -80° C.

A determinação dos mediadores no sobrenadante foi realizada com a tecnologia Luminex xMAP baseada em um painel de esferas magnéticas para reconhecimento de MIP-1b, IFN- γ , IL-1ra, IL-5, GM-CSF, TNFa, RANTES, IL-1. 2, IL-1b, Eotaxina, bFGF, VEGF, PDGF-BB, IP-10, IL-13, IL-4, MCP-1, IL-8, MIP-1a, IL-10, G-CSF, IL- 15, IL-7, IL-12p70, IL-17ra e IL-9 (painel 27-plex, Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EUA) utilizando o equipamento Bio-Plex Magpix

(Bio Rad Laboratories Inc.). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante. A concentração de cada produto secretado foi quantificada usando o software xPONENT v3.1 (LuminexCorp®, EUA). Os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL). Para os esferoides individualizados, o ensaio foi realizado a partir de uma amostra de células (n=1) de cada ponto de tempo (2, 3 e 5 semanas), utilizando três replicatas de cada amostra. Para os esferoides semeados no arcabouço de PLA/CHA, o ensaio foi realizado a partir de uma amostra de células (n=1) de cada ponto de tempo (1 e 2 semanas), utilizando quatro replicatas de cada amostra. Os resultados para esses grupos foram apresentados a partir de um *Heat Map*.

4.6 ENSAIOS DE BIOMECÂNICA PARA OBTENÇÃO DE MÓDULO DE *YOUNG* E TENSÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs

A resistência mecânica à compressão dos esferoides não induzidos e induzidos, foi avaliada utilizando o equipamento Microsquisher (Cell Scale). Nesta análise, após os esferoides serem coletados do hidrogel de agarose micromoldado, o meio de cultura foi removido e estes foram lavados com 1 mL de PBS 0,01 M. Em seguida, um esferoide foi disposto, com auxílio de pipeta, na plataforma do equipamento, que se mantém imersa com PBS a 37°C durante o ensaio. Em seguida, uma placa posicionada acima do esferoide exerceu 5 ciclos de compressão, que corresponde a uma força vertical com amplitude de 25% do diâmetro do esferoide. Cada ciclo foi composto de uma fase de carga de 20 segundos, seguida de recuperação de 10 segundos, sendo a força de resistência à compressão medida em μN a cada ciclo, em um total de cinco ciclos. Após a obtenção dos dados de força, foi realizado o cálculo para obter o módulo de *Young* e de tensão considerando os esferoides mais circulares (razão mais próxima a 1) por motivos de cálculos matemáticos. O módulo de *Young* é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da resistência de um material sólido, ou seja, relacionado ao volume do material. Para os esferoides não induzidos e induzidos, as análises foram realizadas ao final da segunda, terceira e quinta semanas de cultivo, utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

4.7 EXTRAÇÃO DOS mRNAs E ANÁLISE POR Q-PCR DOS ESFEROIDES DE ASCs

A fim de avaliar a expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica, foi realizada a extração dos mRNAs dos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos.

Inicialmente, os esferoides não induzidos (cultivados por 24 h) e induzidos, cultivados por até cinco semanas, foram coletados do interior do hidrogel de agarose micromoldada. Em seguida, os esferoides coletados em tubos de polipropileno de 15 mL, foram lavados em 1 mL de PBS 0,01M e dissociados por sonicação (em uma amplitude de 40%, pulso ligado de 15 e desligado de 10, durante 30 segundos) em 350 µL da solução de RLT proveniente do kit QIAGEN RNeasy® (Applied Biosystems, USA). A suspensão de células obtida foi rompida com a ação mecânica conjunta de uma seringa (BD Biosciences) de volume de 1mL. Em seguida, foram iniciadas as etapas do kit QIAGEN RNeasy® para o isolamento do mRNA seguindo as recomendações do fabricante. Ao final do processo, o mRNA isolado foi quantificado utilizando o equipamento Nanodrop (Thermo Scientific).

Para a reação de Q-PCR, foram utilizadas as sondas humanas de colágeno do tipo X alfa 1 (COLXA1, Hs00166657_m1), fosfatase alcalina (ALP, do inglês *alkaline phosphatase*, Hs01029144_m1), metaloproteinase 13 (MMP-13, Hs00942584_m1) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor A*, Hs05484830_s1). Além disso, foi utilizada a sonda do gene constitutivo RPLP0 nas reações. Todas as sondas foram adquiridas através da ThermoFisher Scientific.

Para iniciar a reação, em resumo, foi utilizado 1,5 µL do RNA total (15ng/µL) e este foi amplificado em *master mix* composto por 5 µL de 2x RT-PCR buffer, 0,4 µL de 25x RT-PCR *enzyme mix* e por fim, a solução de *master mix* foi completada com água livre de nucleases para um volume final de 33 µL. Primers específicos e sondas específicas TaqMan (Applied Biosystems) foram utilizadas. Foi realizada a triplicada para cada amostra de RNA. A reação foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 para PCR em tempo real com um total de 40 ciclos.

Para os esferoides não induzidos, cultivados por 24 h, e induzidos (ao final de duas, três e cinco semanas de cultivo), as análises foram realizadas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

4.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS ESFEROIDES INDUZIDOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) E ELEMENTAR POR MICROANÁLISE DE RAIO-X (EDX)

Com o objetivo de observar a ultraestrutura celular e investigar a presença de mineral em esferoides induzidos, ao final de duas, três e cinco semanas, foram realizadas análises por MET, além de uma análise elementar por microanálise de raios-X (EDX) a fim de obter um resultado semi-quantitativo da presença ou ausência do átomo de cálcio, por comparação relativa.

Inicialmente, os esferoides foram coletados do hidrogel de agarose micromoldado e lavados com PBS 0,01 M. As amostras foram então fixadas em glutaraldeído (Sigma) 2,5% em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M ao abrigo da luz. Posteriormente, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio, pós-fixados em tetróxido de ósmio (Sigma) 1% diluído em cacodilato de sódio 0,1M e mantidos ao abrigo de luz. Sequencialmente, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, os esferoides foram desidratados por lavagens seriadas em acetona. Ao final, as amostras foram gradualmente embebidas em resina epon (Sigma) diluída em acetona. Em seguida, as amostras foram emblocadas em epon (Sigma) a 60°C por 48 h. Secções ultrafinas (<150 nm) do centro e da superfície dos esferoides induzidos foram obtidas utilizando ultramicrotomo RMC (PT-XL PowerTome).

Os esferoides foram eletromicrografados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 2100F, Tokio, Japão), em uma voltagem de aceleração de 200kV, equipado com sistema de dispersão de energia (EDX) (Bruker Nano GmbH) e o *software* Bruker X-Max 65T, o qual foi utilizado para identificar os elementos presentes nas amostras em um parâmetro de tempo morto entre 15-20%. O microscópio foi utilizado no modo TEM (do inglês, *transmission electron microscopy*) e STEM (do inglês, *scanning transmission electron microscopy*). A câmera CCD de 11 megapixels (GATAN Orius) foi utilizada para adquirir imagens no modo TEM. Imagens STEM foram obtidas utilizando detector de campo

escuro anular (ADF). Os espectros de EDX foram obtidos no modo STEM para avaliar a composição das amostras. Para os esferoides induzidos, as análises foram realizadas ao final de duas, três e cinco semanas de cultivo a partir de um doador em replicata técnica.

4.9 ANÁLISE E CINÉTICA DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs

O processo de fusão dos esferoides não induzidos e induzidos foi realizado em uma placa de 96 poços estéril, com um revestimento de agarose ultrapura 2% (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Para ambas as condições, o ensaio do processo de fusão foi realizado ao final de duas, três e cinco semanas de cultivo dos esferoides. Para a análise, foram considerados dupletos e quartetos de esferoides não induzidos e induzidos, os quais foram previamente coletados do hidrogel de agarose micromoldado e dispostos próximos cuidadosamente no interior dos poços, com auxílio de pipeta analítica. Os dupletos e quartetos de esferoides não induzidos e induzidos, foram mantidos em meio de cultivo tridimensional (tabela 1) em atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. A cinética do processo de fusão dos esferoides foi avaliada através de microscópio óptico invertido equipado com câmera digital (Leica DFC 500) durante 7 dias. Para os dupletos e quartetos de esferoides não induzidos e induzidos, as análises foram realizadas a partir de um mesmo doador em dez replicatas técnicas.

4.10 ANÁLISE DE VIABILIDADE DOS ESFEROIDES FUSIONADOS

Para as análises de viabilidade celular foi utilizado o kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD Cell Double Staining Kit*® (Invitrogen). O kit de coloração dupla de células vivas/mortas é utilizado para coloração fluorescente simultânea de células. Este kit contém soluções de calceína-AM e homodímero de etídio, que coram células viáveis e mortas, respectivamente. Foi realizado o teste de viabilidade na fusão do quarteto de esferoides de ASCs ao final da cinética de 7 dias. A análise consiste na emissão de fluorescência verde caso ocorra marcação de calceína citoplasmática (corante verde que atravessa a membrana plasmática de células vivas) e na interação do intercalante de DNA (homodímero-1 de etídio) emitindo fluorescência vermelha, sendo indicativo de

morte celular. As amostras foram em seguida analisadas em microscópio óptico de fluorescência com deconvolução (LEICA DMI 6000).

4.11 MEDIÇÃO DE ÂNGULOS DOS ESFEROIDES DURANTE O PROCESSO DE FUSÃO

A medição do processo de fusão de dupletos dos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos, tais como o comprimento total do duplete, os ângulos de contato e o diâmetro da área de contato, foram realizados com o auxílio do *software* Measure™ 2.0 (C Thing Software, Califórnia, Estados Unidos). Pelo *software* é possível medir os comprimentos e ângulos a partir da contagem de *pixels* da tela do monitor, formados durante a cinética do processo de fusão. Por utilizar as barras de escala pré-configuradas, é possível inserir barras de marcação das dimensões específicas, com a vantagem de utilizar o ajuste de escala de *pixel/mm* e o auxílio de uma régua calibrada por comparação direta. Após obter as imagens por microscopia óptica de contraste de fase, as barras de marcação do próprio programa foram utilizadas para calcular o comprimento e a variação dos ângulos de contato dos esferoides durante o processo de fusão.

4.12 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS ESFEROIDES FUSIONADOS: FIXAÇÃO, INCLUSÃO E EMBLOCAMENTO

Inicialmente, os quartetos de esferoides induzidos, submetidos ao processo de fusão em meio não indutor e indutor osteogênico, foram coletados do interior dos poços e lavados com solução de PBS 0,01 M. Em seguida, os esferoides fusionados foram fixados com paraformaldeído (Sigma) 4% tamponado em PBS 0,01 M. Após esse período, os esferoides foram lavados com PBS 0,01 M e com água destilada, sendo posteriormente lavados em banhos seriados crescentes de etanol (Sigma). Em seguida, foram realizados banhos em xileno (Sigma). Posteriormente, foram realizados banhos em parafina líquida (Sigma). Por fim, os esferoides fusionados foram emblocados em parafina.

Os blocos de parafina contendo os esferoides induzidos fusionados foram seccionados em micrótomo (Slee Medical – Cut 5062) a fim de obter secções de

5 µm de espessura, coletados em lâminas de vidro tratadas com poli-L-lisina 0,01% (Sigma) e lâminas silanizadas (Starfrost®). As secções foram utilizadas para coloração com Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma), com Alizarina vermelha (Sigma) e para avaliações por imuno-histoquímica.

As análises com os quartetos de esferoides induzidos (nos pontos de duas, três e cinco semanas) foram realizadas ao final de sete dias do processo de fusão com cinco replicatas técnicas. Este experimento foi repetido três vezes.

4.13 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM HEMATOXILINA E EOSINA

Com o intuito de avaliar a morfologia dos quartetos de esferoides induzidos, submetidos ao processo de fusão em meio não indutor e indutor osteogênico, foi realizada a coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).

As secções foram deparafinizadas em estufa a 60°C seguido de banhos sucessivos de xileno. Em seguida, foi iniciado o processo de reidratação das secções em banhos decrescentes de etanol por 2 minutos cada. As secções foram sequencialmente coradas com solução 1:4 Hematoxilina de Harris (Sigma) em água destilada. Em seguida, as secções foram coradas em Eosina alcoólica (Sigma). Posteriormente, foram iniciadas as etapas de desidratação das secções a partir de banhos de etanol. As secções foram sequencialmente clarificadas em xileno. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas em *Entellan* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). As secções coradas foram analisadas no modo campo claro em um microscópio óptico equipado com câmera digital (Leica DM 2500).

As análises com os quartetos de esferoides induzidos (nos pontos de duas, três e cinco semanas) foram realizadas ao final de sete dias do processo de fusão, utilizando um único doador com cinco replicatas técnicas. Este experimento foi repetido três vezes.

4.14 COLORAÇÃO HISTOLÓGICA COM ALIZARINA VERMELHA

Com o intuito de avaliar a presença de depósitos de cálcio típicos do processo de diferenciação osteogênica, nos quartetos de esferoides induzidos,

submetidos ao processo de fusão em meio não indutor e indutor osteogênico, foi realizada a coloração por Alizarina vermelha (Sigma).

Inicialmente, foram seguidas as mesmas etapas de desparafinação e reidratação descritas no tópico 5.13. Ao final do processo de reidratação, as secções foram coradas com Alizarina vermelha e em seguida, contra-coradas com solução 1:4 Hematoxilina de Harris. Posteriormente, foram seguidas as mesmas etapas de desidratação, clarificação, montagem e observação das lâminas descritas no tópico 5.13.

As análises com os quartetos de esferoides induzidos (nos pontos de duas, três e cinco semanas) foram realizadas ao final de sete dias do processo de fusão, utilizando um único doador com cinco replicatas técnicas. Foram analisadas 3 secções por lâmina. Este experimento foi repetido três vezes.

4.15 ANÁLISES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS ESFEROIDES FUSIONADOS

Com o objetivo de analisar a eficácia da diferenciação osteogênica nos quartetos de esferoides induzidos, submetidos ao processo de fusão, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais para identificar moléculas características da matriz extracelular do tecido ósseo e relacionadas a esta via de diferenciação. Além disso, foram realizadas análises para observar a presença de moléculas de adesão celular.

As secções para imuno-histoquímica foram coletadas em lâminas silanizadas (Starfrost®). As amostras foram deparafinizadas na estufa a 60°C seguido. As secções foram hidratadas em banhos seriados de etanol em concentrações decrescentes.

Em seguida, foi realizada uma etapa de recuperação enzimática de sítios antigênicos utilizando a enzima Condroitinase ABC 0,01% (Sigma), conforme recomendação do fabricante, para as secções que foram marcadas com anticorpos anti-humanos para Colágeno I (todos da Abcam, Cambridge, UK). Esta etapa não foi necessária para os demais alvos avaliados.

A reação de imuno-histoquímica foi realizada utilizando-se um kit da Biogen (Spring – Cód. SPD-125) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 1 hora. Os anticorpos

primários, com a espécie de obtenção, utilizados com as diluições correspondentes estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Anticorpos com as espécies de obtenção e suas respectivas diluições de uso para o ensaio de imuno-histoquímica.

Anticorpos	Espécie de obtenção	Diluição de uso
Colágeno I	<i>Mouse</i>	1:100
Colágeno X	<i>Mouse</i>	1:50
N-Caderina	<i>Mouse</i>	1:800
Osteocalcina	<i>Mouse</i>	1:200

Ao final do protocolo, as secções foram incubadas com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, Spring). Por fim, as secções foram cuidadosamente lavadas em tampão e contra-coradas com solução de 1:4 Hematoxilina de Harris. Ao final deste período, as amostras foram desidratadas em banhos seriados de concentrações de etanol crescentes e clarificados em banhos de xileno. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas em *Entellan*.

As análises com os quartetos de esferoides induzidos (nos pontos de duas, três e cinco semanas) foram realizadas ao final de sete dias do processo de fusão, utilizando um único doador com cinco replicatas técnicas. Este experimento foi repetido três vezes.

4.16 FABRICAÇÃO DOS ARCABOUÇOS DE PLA/CHA POR MANUFATURA ADITIVA

Os arcabouços 3D impressos de poli (ácido láctico)/carbonato apatita (PLA/CHA) foram produzidos como descrito anteriormente (PALHARES *et al.*, 2021). Inicialmente, o PLA utilizado foi obtido da Natureworks Ingeo 4043D na forma de esferas e usado como recebido, de acordo com as recomendações do fabricante. A hidroxiapatita carbonatada (CHA) tipo-B foi sintetizada em meio aquoso a partir de uma solução de hidrogenofosfato de diamônio ((NH₄)₂HPO₄)

contendo carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃). Após a mistura, o sólido obtido foi liofilizado, transformado em pó, peneirado em malha de 90 µm e por fim, mantido em um dessecador.

Os filamentos de PLA/CHA para a técnica de modelagem de deposição de filamentos (FDM) foram produzidos em uma impressora extrusora de parafuso duplo (Haake Rheomex OS Prw16, Thermo Scientific). As esferas de PLA foram fisicamente misturadas de acordo com a proporção (% em massa) de 10% CHA. Em seguida, os filamentos foram adicionados ao cabeçote da extrusora, onde foram misturados em um perfil de temperatura de fusão de 150/160/170/180/185/190°C ao longo do equipamento. Os arcabouços de PLA/CHA foram projetados utilizando o *software* de modelagem 3D Autodesk Fusion 360. A impressora 3D utilizada foi a Graber i3 da marca Voolt3D, que possui uma impressora com *nozzle* de 0,4 mm. Os modelos foram configurados no *software* Simplify3D versão 3.0.2.

4.17 SEMEADURA DOS ESFEROIDES DE ASCs NO ARCABOUÇO 3D IMPRESSO DE PLA/CHA

Inicialmente, para a semeadura dos esferoides não induzidos, os arcabouços retangulares (7 mm de área, 400 µm ou 500 µm de espaçamento e 3 ou 4 camadas – abertas ou fechadas - de filamento de PLA/CHA) foram posicionados em poços de uma placa de 24 poços. No caso dos arcabouços circulares (7mm de área, 400µm de espaçamento e 4 camadas de filamento - sendo a última camada completamente fechada - de PLA/CHA), estes foram posicionados em poços de uma placa de 48 poços.

Em seguida, um total de 162 esferoides não induzidos (com 24 h de formação) foram semeados aos poucos e de forma dispersa na superfície dos arcabouços. Os arcabouços contendo os esferoides semeados foram mantidos em meio de cultivo tridimensional durante 7 dias na estufa com 5% de CO₂ a 37° C. Os construídos foram monitorados pela visualização com microscópio óptico invertido ou lupa.

Para a semeadura dos esferoides induzidos a hipertrofia, dois protocolos diferentes foram investigados. No primeiro protocolo, os esferoides induzidos foram mantidos em cultivo por 2 semanas em meio indutor condrogênico e após

esse período, foram semeados na superfície do arcabouço de PLA/CHA (7 mm de área, 400 µm de espaçamento e 4 camadas) e mantidos por mais 1 semana em meio indutor condrogênico. No segundo protocolo, os esferoides induzidos foram mantidos por até 48h em meio indutor condrogênico e semeados na superfície do arcabouço de PLA/CHA (7 mm de área, 400 µm de espaçamento e 4 camadas). Em seguida, os construídos foram mantidos por 2 semanas em meio indutor condrogênico.

Da mesma forma, um total de 162 esferoides induzidos a hipertrofia foram semeados aos poucos e de forma dispersa na superfície dos arcabouços. Os arcabouços contendo os esferoides semeados foram mantidos na estufa com 5% de CO₂ a 37° C. Os construídos foram monitorados pela visualização com microscópio óptico invertido (Zeiss) ou lupa (Leica).

4.18 ANÁLISE ESTRUTURAL DA SUPERFÍCIE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Com o objetivo de avaliar a interação dos esferoides não induzidos e induzidos com os arcabouços retangulares e a ultraestrutura da superfície dos esferoides semeados, foram realizadas análises por MEV.

Inicialmente, os construídos (esferoides semeados nos arcabouços) foram coletados e lavados com PBS 0,01 M. As amostras foram então fixadas em glutaraldeído (Sigma) 2,5% em tampão cacodilato de sódio (Sigma) 0,1 M. Posteriormente, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio, pós-fixados em tetróxido de ósmio (Sigma) 1% diluído em cacodilato de sódio 0,1 M e mantidos ao abrigo de luz. Sequencialmente, os esferoides foram lavados com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Em seguida, os esferoides foram desidratados por lavagens seriadas em soluções de etanol. Após a desidratação, as amostras foram secas em aparelho de ponto crítico (Leica/CPDO30) e, posteriormente, recobertas com 10 nm de ouro pelo equipamento *sputtering* (DENTON VACUUM).

As amostras foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (VEGA3 TESCAN) em uma voltagem de 5.0 kV. Para os esferoides não induzidos semeados nos arcabouços retangulares, as análises foram realizadas

ao final de uma semana de cultivo a partir de dois doadores em três replicatas experimentais.

4.19 GRUPOS EXPERIMENTAIS DE ENSAIO DE DEFEITO CRÍTICO EM CRÂNIO DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

Para os ensaios de defeito crítico em crânio de ratos *Wistar*, foram utilizados os arcabouços circulares, com 7 mm de área, 400 µm de espaçamento e 3 camadas de filamento (sendo a última camada completamente fechada) de PLA/CHA com ou sem esferoides não induzidos e induzidos semeados.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA-UFF) sob o nº 1474030618 (anexo II). Na presente pesquisa foram utilizados 72 ratos Wistar, fêmeas, de 2 a 4 meses de idade, pesando entre 180 e 300 gramas, fornecidos pelo Núcleo de Animais de Laboratório (NAL), localizado na Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro.

Todos os procedimentos cirúrgicos nos animais deste estudo foram realizados em colaboração com o Laboratório de Experimentação Animal (LEA), também localizado na UFF. Todos os animais foram mantidos durante todo o período deste estudo em mini-isoladores (n=3) e alimentados com ração peletizada e água à vontade. Os animais foram distribuídos de forma aleatória com a utilização de envelopes para sua alocação em cada grupo experimental (n=6), totalizando 24 animais para cada período experimental (1, 3 e 6 meses).

Os animais foram alocados entre os 4 grupos experimentais deste estudo: Grupo I, PLA /CHA PURO; Grupo II, PLA /CHA + esferoides não induzidos; Grupo III, PLA /CHA + esferoides induzidos a hipertrofia; Grupo IV, Coágulo (Tabela 3). Após o término dos procedimentos cirúrgicos, os tecidos moles foram reposicionados através de sutura com fio de Nylon 5.0 (Mononylon® - Ethicon – Vila Olímpia, São Paulo, SP, Brasil) para a proteção do leito cirúrgico (Fig. 27).

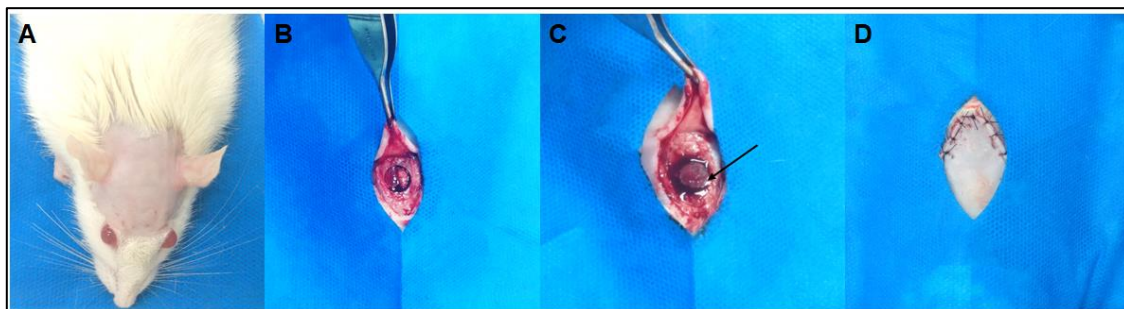


Figura 27: Implante dos grupos de arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com e sem esferoides de ASCs não induzidos ou induzidos em modelo de defeito ósseo crítico em calvária de ratos *Wistar*. (A) Procedimento de tricotomia da região frontoparietal realizado no crânio de um animal da espécie *Rattus norvegicus*. (B) Defeito ósseo crítico feito com trefina cirúrgica de 8mm. (C) Preenchimento da lesão com o grupo biomaterial e esferoides não induzidos (seta) de forma representativa. (D) Processo de suturação do tecido após o procedimento cirúrgico.

Após a recuperação anestésica, os ratos retornaram aos minis – isoladores (n=3), sendo permitido aos animais ração e água à vontade. Todos os animais foram observados diariamente a fim de avaliar qualquer complicação pós-cirúrgica com infecção e/ou dor. Os animais receberam como medicação pós-operatória, Meloxicam (Maxicam® - Ourofino pet - Osasco, São Paulo, SP, Brasil) injetável 15 mg/1,5 mL): 1 mg/kg a cada 24 horas Cloridrato de tramadol (Tramal® - Pfizer, São Paulo, SP, Brasil): 10 mg/kg, via subcutânea a cada 8 horas, por um período de 3 dias.

Tabela 3: Grupos, períodos experimentais e total de animais utilizados no ensaio *in vivo*.

Grupos/períodos	1 mês	3 meses	6 meses
PLA/CHA	6 animais	6 animais	6 animais
PLA/CHA + esferoides não induzidos	6 animais	6 animais	6 animais
PLA/CHA + esferoides induzidos a hipertrofia	6 animais	6 animais	6 animais

Coágulo	6 animais	6 animais	6 animais
----------------	-----------	-----------	-----------

4.20 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E PROCESSAMENTO

Após os períodos experimentais de 1, 3 e 6 meses, os animais foram eutanasiados (n=6) com sobredosagem letal de anestésico geral, 200 mg/kg de quetamina (Francotar® – Virbac, Jurubatuba, São Paulo, SP, Brasil) e 20 mg/kg de xilazina (Sedazine® – Fort Dodge, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), em uma mesma seringa e administrado por via intramuscular. A obtenção das amostras só foi iniciada após a ausência de sinais vitais dos animais.

O bloco ósseo contendo a calota craniana do animal foi realizada com uma broca esférica carbide longa nº 6 (Esférica baixe nº 6 FG®, FG, São Paulo, SP, Brasil), acoplada a um micromotor (Micromotor Marathon 3 Champion – Talma, São Paulo, SP, Brasil).

As cinco amostras de cada grupo experimental foram dissecadas para remoção do tecido mole e fixadas durante 48 horas em formol 4% tamponado (tampão fosfato, pH 7,4) e submetidas a procedimento histológico padrão do Laboratório de Biotecnologia Aplicada da UFF (LABA /UFF). Secções longitudinais (n=3) da maxila do animal com 5 µm de espessura nos blocos de parafina foram obtidas em um micrótomo e montadas em lâminas para microscópio para posteriores colorações por Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

4.21 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

A análise histológica descritiva das lâminas foi realizada no Laboratório de Pesquisa Clínica em Odontologia (LPCO/UFF) utilizando um microscópio de Luz de Campo Claro (OLYMPUS® BX43, Tóquio, Japão). As capturas de imagens selecionadas foram realizadas através de uma câmera de alta resolução (OLYMPUS® SC100, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio, associada a um *software* (CELLSENS® 1.9 Digital Image, Tóquio, Japão). Foram utilizadas as objetivas de 4X para visualização mais ampla da área de interesse e de 20X para obtenção de maiores detalhes celulares e teciduais. Em cada

lâmina, foram observados presença de osso neoformado, biomaterial (quando presente) e tecido conjuntivo.

4.22 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Imagens digitais das lâminas coradas em HE e TM, foram obtidas através de um microscópio de Luz de Campo Claro (OLYMPUS®, Tóquio, Japão). Um campo corrido por varredura correspondente à área de interesse, sem sobreposição foram capturados por um *software* (CELLSENS® 1.9 Digital Image, Olympus, Tóquio, Japão) com a objetiva de 40X. Em cada fotomicrografia foram classificadas áreas correspondentes a osso neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo, sendo a interface de captura disponibilizada pelo *software* ImageJ. Os resultados foram automaticamente transferidos para uma planilha do *software* Microsoft Excel® (Windows Office 2016) para sua posterior análise estatística. A análise estatística foi realizada por um único observador cego quanto aos grupos experimentais.

4.23 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste t múltiplo foi aplicado para as comparações entre esferoides de ASCs não induzidos e induzidos nos resultados de qPCR. As comparações de diâmetro dos esferoides de ASCs ao longo de 24 h, 3 dias e 7 dias, produzidos pela plataforma automatizada EpMotion5070 (Eppendorf), foram realizadas a partir do *one-way* ANOVA, seguido por comparações múltiplas entre os grupos. As comparações de esferoides de ASCs induzidos ao longo de duas, três e cinco semanas de cultura, foram realizadas a partir do 2-way ANOVA, seguido por comparações múltiplas entre os grupos. Para a histomorfometria, a análise de *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey foram aplicados para investigar as diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais para as variáveis de quantificação de osso neoformado, tecido conjuntivo e biomaterial em *log*. Os resultados nos gráficos foram expressos como média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, EUA).

5. RESULTADOS: PARTE A

5.1 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES DE ASCs

Para a produção de esferoides, inicialmente foi realizada a fabricação do hidrogel de agarose micromoldado a partir do molde de silicone *3D Petri Dish*® (Fig. 29). Cada hidrogel de agarose micromoldado formado apresenta um total de 81 ressecções, de forma que um total de 81 esferoides foram formados após a etapa de semeadura de células.

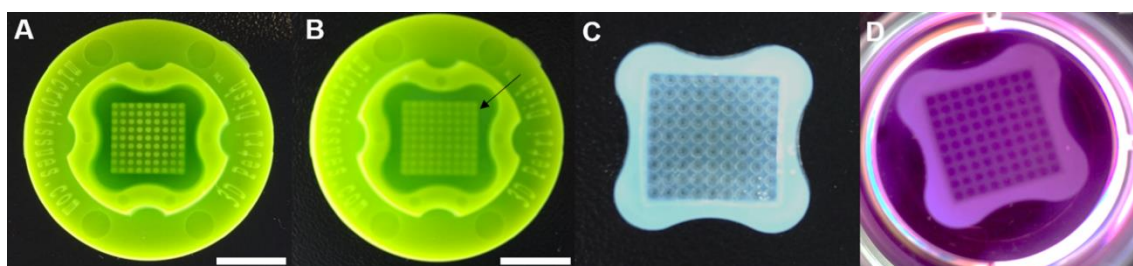


Figura 28: Etapas de preparo da agarose micromoldada em *3D Petri Dish*®. (A) Molde de silicone *3D Petri Dish*® contendo 81 projeções em sua região central. (B) Molde de silicone após ter sido dispensada a agarose em seu interior. A seta aponta a região em que a agarose se deposita após ser dispensada. Barra de escala de 1cm. (C) Hidrogel de agarose micromoldada desenformada do molde, contendo 81 ressecções. (D) Hidrogel de agarose micromoldada inserida no poço da placa de cultura com meio de cultura.

Os esferoides individualizados nas ressecções foram fabricados em um período de 24h a partir das ASCs em monocamada (Fig. 29). Ao final deste período, a compactação celular foi concluída no hidrogel de agarose micromoldado.

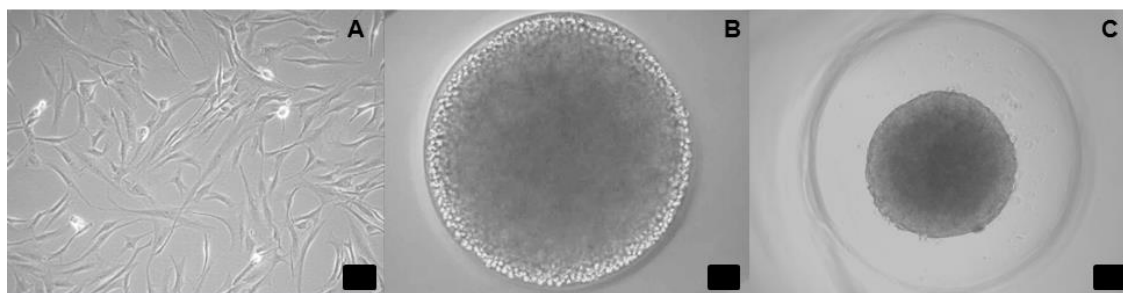


Figura 29: Etapas de produção dos esferoides em hidrogel de agarose micromoldado. (A) Monocamada de ASCs com morfologia fusiforme após 4 dias de cultivo em segunda passagem. (B) Células sedimentadas no interior de uma única ressecção 40 minutos após a etapa de semeadura destas células. (C) Compactação das células após 24 horas da semeadura das ASCs. Barra de aumento: 100 μm .

5.2 CARACTERIZAÇÃO DE HOMOGENEIDADE DE TAMANHO E FORMA DOS ESFEROIDES DE ASCs NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA

5.2.1 Esferoides de ASCs induzidos apresentam maior diâmetro e homogeneidade de tamanho do que esferoides da condição não induzida

Para analisar o tamanho e a homogeneidade do tamanho dos esferoides não induzidos e induzidos ao longo do tempo (duas, três e cinco semanas), foi realizada a medição dos diâmetros maior e menor dos esferoides e o cálculo da razão entre estes diâmetros (Fig. 30).

Foi observada uma diferença de média de diâmetro entre esferoides induzidos e não-induzidos a partir da segunda semana de indução até o final do experimento (Fig. 30A). Após duas semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram uma média de diâmetro de 330 μm , ao passo que os esferoides induzidos tiveram uma média de diâmetro de 430 μm . Já em cinco semanas, os esferoides não-induzidos apresentaram um pequeno aumento em seu diâmetro para uma média de 350 μm e os esferoides induzidos mantiveram suas médias de diâmetro em 430 μm . Estas diferenças entre o diâmetro de esferoides induzidos e não induzidos a partir da segunda semana apresentou significância estatística.

Sendo assim, houve uma tendência de diminuição do diâmetro dos esferoides não induzidos a partir da segunda semana (com uma recuperação em cinco semanas), o que não foi observado para os esferoides induzidos por TGF-

$\beta 3$ (Fig. 30A). Não houve diferença significativa das razões de diâmetro entre os esferoides induzidos e não-induzidos ao longo do tempo de cultivo ($p > 0,2787$) (Fig. 30B).

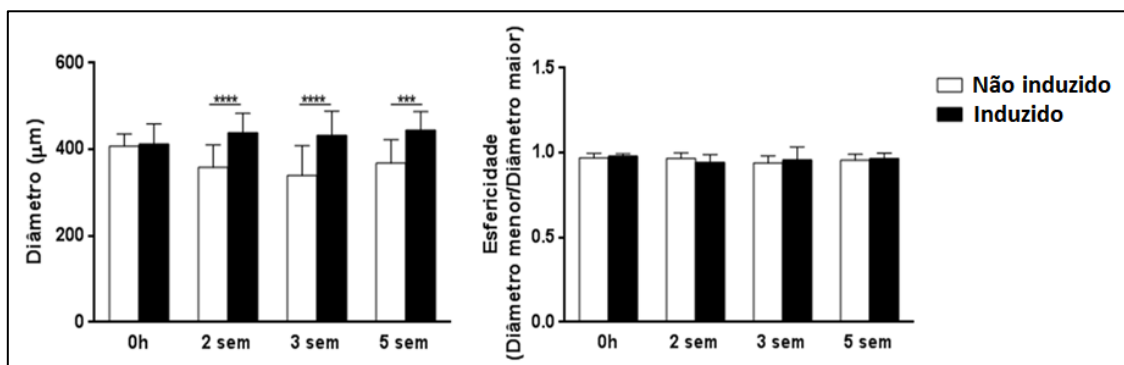


Figura 31: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de razão entre os diâmetros dos esferoides não induzidos e induzidos ao longo de cinco semanas de cultivo. (A) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides não induzidos e induzidos. (B) Valores de razão entre os diâmetros dos esferoides não induzidos e induzidos. 2 sem (duas semanas); 3 sem (três semanas); 5 sem (cinco semanas). Os asteriscos indicam valores de p obtidos por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

5.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DOS ESFEROIDES DE ASCs

Os resultados apresentados nos tópicos a seguir correspondem a uma continuação da dissertação publicada anteriormente nesta temática (KRONENBERGER, 2020). Dessa forma, os resultados de caracterização morfológica dos esferoides não induzidos e induzidos a hipertrofia individualizados já foram descritos (KRONENBERGER, 2020).

5.3.1 Expressão de genes relacionados à eventos de hipertrofia em esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica

Foram realizados ensaios de PCR utilizando sondas para fosfatase alcalina (ALP, Alkaline Phosphatase), metaloproteinase 13 (MMP-13), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor) e colágeno do tipo X alfa 1 (COLXA1), um gene relacionado especificamente a eventos de hipertrofia em condrócitos (Fig. 31).

Foi possível verificar que os esferoides induzidos, quando comparados aos esferoides não induzidos, apresentam uma expressão vinte vezes maior de COLXA1 em duas semanas de cultivo, com uma diferença estatística significativa quando comparado com três e cinco semanas (Fig. 31A), uma *up*-regulação de VEGF em duas semanas, com significância estatística, quando comparada com cinco semanas (Fig. 31B), uma expressão doze vezes maior de MMP-13 em duas semanas, estatisticamente significativa, quando comparada com cinco semanas (Fig. 31C) e uma expressão trinta vezes maior de ALP em cinco semanas, estatisticamente significativa quando comparado com duas semanas (Fig. 31D).

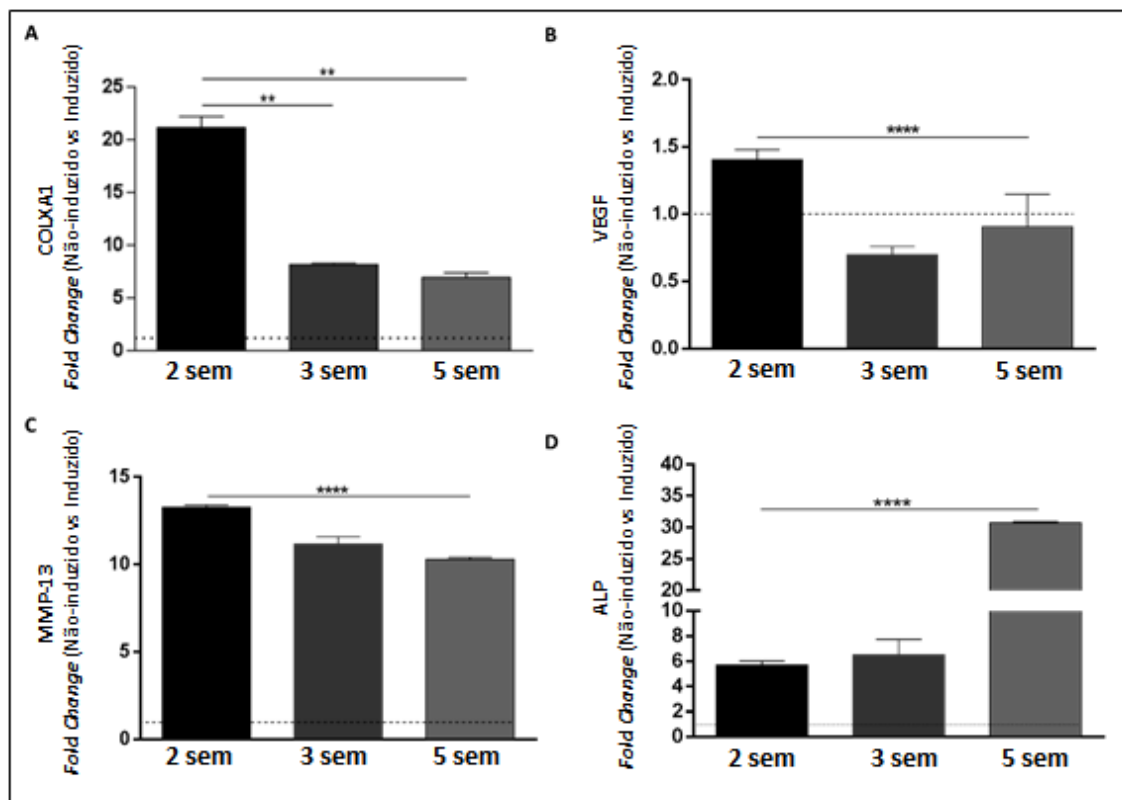


Figura 31: Expressão de genes relacionados ao processo de diferenciação osteogênica por Q-PCR em esferoides não induzidos e induzidos em duas, três e cinco semanas. Comparação relativa da expressão gênica de (A) COLXA1, (B) VEGF, (C) MMP-13 e (D) ALP por esferoides induzidos em comparação aos esferoides da condição não induzida. As linhas contínuas indicam análises de teste t múltiplo, o qual foi empregado a fim de analisar a diferença estatística entre os esferoides não induzidos e induzidos. 2 sem (duas semanas); 3 sem (três semanas); 5 sem (cinco semanas). Os asteriscos indicam valores de p obtidos no teste t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

5.3.2 Os esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica apresentam diferenças na ultraestrutura celular ao longo do período de cultivo e ausência de cristalização na matriz extracelular

A fim de avaliar a ultraestrutura celular dos esferoides induzidos e a presença de formação de cristais de cálcio e fosfato na matriz extracelular ao longo do período de cultivo, foram feitas análises por MET. Os esferoides induzidos apresentaram uma maior distribuição das fibras de matriz extracelular ao final de cinco semanas de cultivo (Fig. 32E) em comparação com três (Fig. 32C) e duas semanas (Fig. 32A). Além disso, os esferoides induzidos ao final de duas (Fig. 32A) e três semanas (Fig. 32C), apresentaram estruturas arredondadas sobre as fibras, o que não foi observado em cinco semanas (Fig. 32E). Não houve indicação da presença de mineral ou cristalização ao longo das semanas de cultivo, que corresponde a uma característica funcional de maturação do tecido ósseo.

Com o intuito de verificar a presença do átomo de cálcio e fósforo, por quantificação relativa, no interior dos esferoides induzidos ao longo das semanas de cultivo, foram realizadas microanálises de raio-X (EDX) nos cortes das amostras de esferoides processadas para MET.

Pela análise elementar, foi possível detectar um sinal dos átomos de cálcio e fósforo nos esferoides induzidos ao longo das semanas de cultivo (Fig. 32B, D e F). Nos esferoides induzidos cultivados em duas, três e cinco semanas, além de cálcio e fósforo, foi detectada a presença dos elementos: ferro, cobre, ósmio e oxigênio (Fig. 32B, D e F).

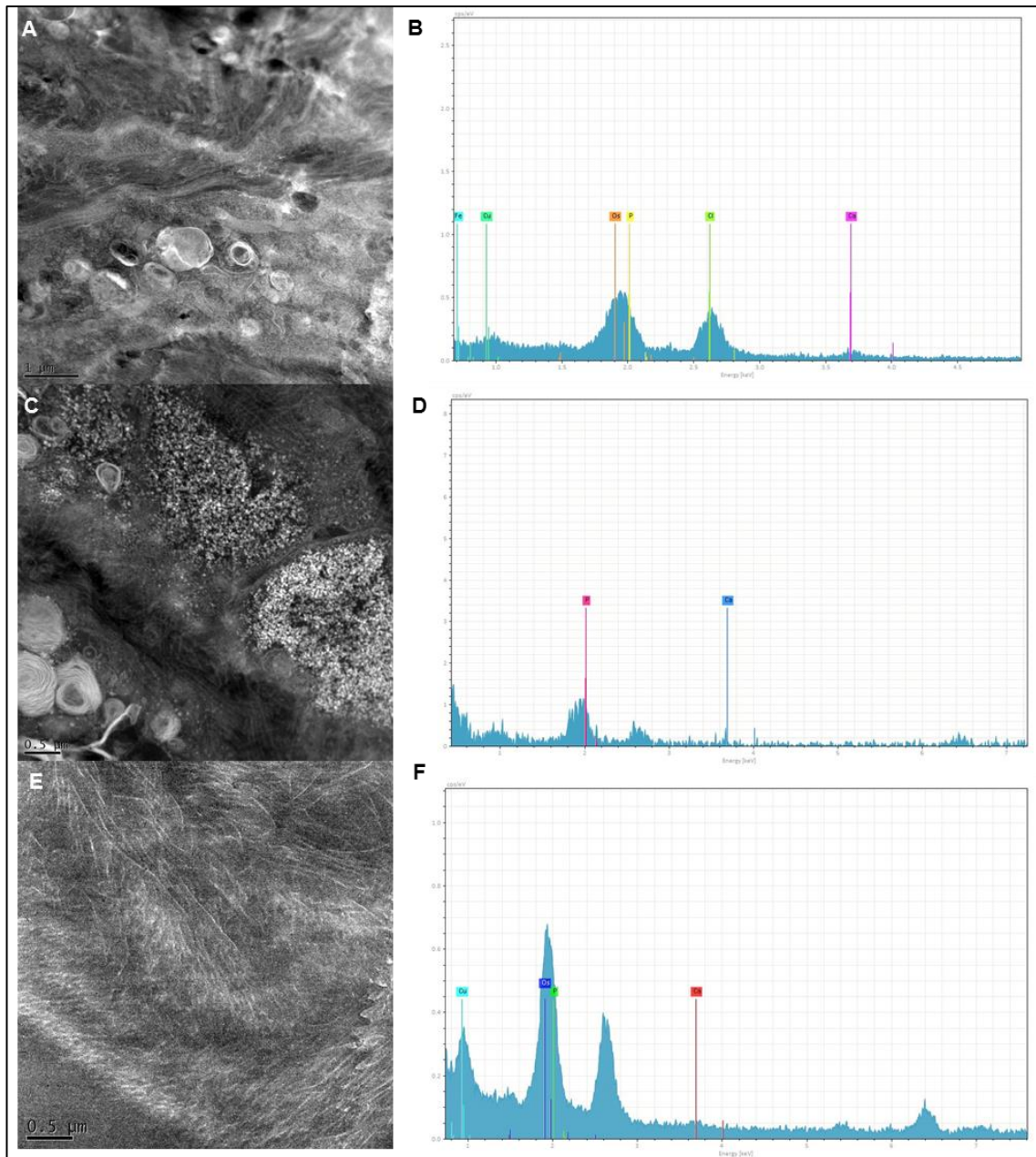


Figura 32: Ausência de cristalização em esferoides induzidos para a via osteogênica. Micrografias eletrônicas de transmissão de esferoides induzidos em duas (A), três (C) e cinco semanas (E) de cultivo. Observe a presença de fibras da matriz extracelular em esferoides induzidos cultivados em três (A, seta branca) e cinco (B, seta preta) semanas. Nenhuma estrutura mineral ou cristalização, foi observada nos esferoides induzidos. Gráficos de dispersão de energia por raios X (EDX) de esferoides induzidos por duas (B), três (D) e cinco (F) semanas de cultivo. Fe: ferro, Ca: cálcio, P: fósforo, Os: ósmio, Cu: cobre, O: oxigênio. Barra de aumento: A – 1 μm; B e C – 0,5 μm.

5.3.3 Elevada secreção de mediadores solúveis por esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica

Os esferoides induzidos, quando comparado aos esferoides não induzidos, apresentaram uma elevada secreção de IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-15, IFN- γ , GM-CSF, RANTES, Eotaxina, bFGF, VEGF e MCP-1 em duas semanas de cultivo (Fig. 33).

Os níveis de interleucinas IL-6 (Fig. 33A), IL-8 (Fig. 33B), IL-10 (Fig. 33C), IFN- γ (Fig. 33F), bFGF (Fig. 33H), VEGF (Fig. 33J) e RANTES (Fig. 33K) diminuiu a partir de três semanas em esferoides induzidos. Nos esferoides não induzidos, os níveis desses mediadores foram baixos (Fig. 33). Os níveis de IL-6 (Fig. 33A) e IL-10 (Fig. 33C) nos esferoides induzidos apresentaram significância estatística quando comparados aos esferoides não induzidos ao final de três semanas. Para IFN- γ (Fig. 33F), bFGF (Fig. 33H), VEGF (Fig. 33J) e RANTES (Fig. 33K), houve também uma diferença significativa entre os esferoides induzidos e não induzidos em duas e entre esferoides induzidos ao final de duas e cinco semanas.

A síntese de GM-CSF (Fig. 33L) e de IL-15 (Fig. 33E) foi elevada em duas semanas, diminuiu ao final de três semanas e aumentou em cinco semanas. Apesar do aumento observado na síntese de GM-CSF em cinco semanas de cultivo, os níveis desse fator de crescimento ainda são maiores em duas semanas. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os esferoides não induzidos e induzidos ao final de duas semanas ($p < 0,0005$).

Os mediadores IL-1ra, IL-5, TNF α , IL-2, IL-1b, G-CSF, TNF α , PDGF-BB, IL-13, IL-4, MIP-1a, IL-7, IL-17ra e IL-9 não apresentaram níveis detectáveis no meio de cultura de esferoides não induzidos e induzidos.

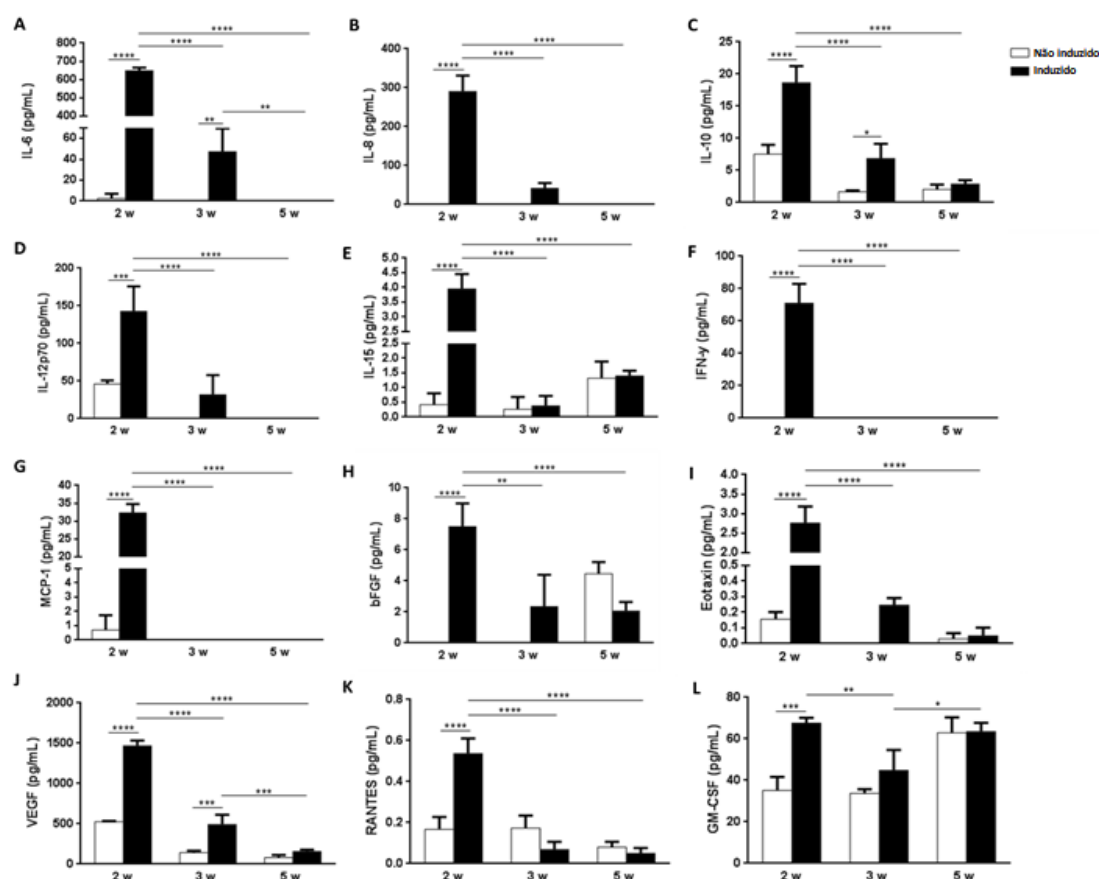


Figura 33: Esferoides induzidos para a via osteogênica apresentaram uma elevada secreção de diferentes mediadores relacionados à osteogênese em duas semanas de cultivo. Secreção de IL-6 (A), IL-8 (B), IL-10 (C), IL-12p70 (D), IL-15 (E), IFN- γ (F), MCP-1 (G), bFGF (H), Eotaxina (I), VEGF (J), RANTES (K) e GM-CSF (L) de esferoides não induzidos e induzidos em duas, três e cinco semanas de cultivo. IL-6 (interleucina-6); IL-8 (interleucina-8); IL-10 (interleucina-10); IL-12p70 (interleucina-12); IL-15 (interleucina-15); IFN- γ (interferon- γ); MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1); bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). Os dados são expressos como média $\pm$ DP. 2w: 2 semanas, 3w: 3 semanas; 5w: 5 semanas após a indução. Os asteriscos indicam valores de p obtidos por *two-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

5.3.4 Esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica apresentam uma elevada resistência mecânica à compressão

Com o objetivo de avaliar a funcionalidade dos esferoides, não induzidos e induzidos, foram realizadas análises de resistência à compressão mecânica para obtenção do módulo de *Young* e dos valores de tensão (Fig. 34).

Os esferoides induzidos apresentaram um aumento de 10x do módulo de *Young* em três semanas (125kPa) (Fig. 34C), com significância estatística,

quando comparado com o valor encontrado nos esferoides não induzidos (10kPa). Em cinco semanas, houve uma redução significativa no módulo de *Young* nos esferoides induzidos, de 10 vezes quando comparado a duas semanas e três semanas (Fig. 34C). O comportamento de estresse mecânico dos esferoides induzidos (Fig. 34D) foi semelhante ao observado no módulo de *Young* (Fig. 34C). Houve diferença estatística significativa entre os esferoides não induzidos e induzidos em duas semanas e em três semanas.

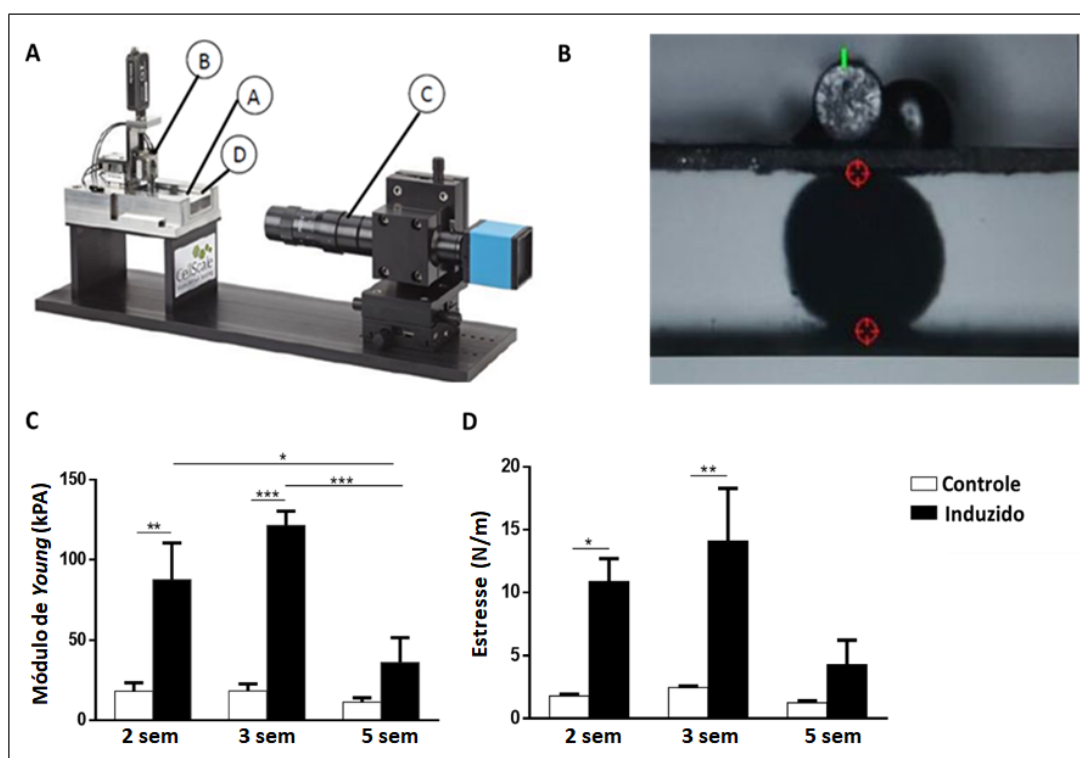


Figura 34: Alta resistência mecânica dos esferoides induzidos para a via osteogênica. (A) Visão do Microsquisher (Cell Scale); A: banho maria; B: sensor de temperatura; C: estrutura óptica; D: placa metálica e suporte. (B) Esferoide entre as duas placas de Microsquisher. (C) Módulo de Young para esferoides não induzidos e induzidos. (D) Tensão para esferoides não induzidos e induzidos. Em duas e três semanas, houve diferença estatisticamente significativa entre esferoides induzidos e não induzidos para o módulo de Young ($p < 0,001$) (C). Note que também houve diferença estatisticamente significativa entre os esferoides induzidos entre três e cinco semanas ($p < 0,001$) e entre duas e cinco semanas ($p < 0,05$) (C). Para o estresse, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os esferoides não induzidos e induzidos em duas semanas ($p < 0,05$) e em três semanas ($p < 0,001$) (D). 2 sem (duas semanas); 3 sem (três semanas); 5 sem (cinco semanas). Os asteriscos indicam valores de p obtidos por *two-way ANOVA* não paramétrico e não pareado, seguida por múltiplas comparações (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

5.3.5 Esferoides de ASCs induzidos apresentam um comportamento plástico no primeiro ciclo de compressão

Esferoides de ASCs não induzidos (Fig. 35A, C e E) apresentam respostas semelhantes às forças de resistência mecânica à compressão durante todo o período de cultura. Por outro lado, os esferoides induzidos mostraram heterogeneidade em sua resposta mecânica, diminuindo sua resistência à força de compressão no ciclo 2 (Fig. 35B, D e F). Os esferoides não induzidos apresentaram comportamento viscoelástico estável ao longo de seus cinco ciclos, de forma distinta dos esferoides induzidos. Os esferoides induzidos mostraram em seu primeiro ciclo de compressão um comportamento plástico (Fig. 35B, D e F). Esta mudança de comportamento plástico para viscoelástico (entre o primeiro ciclo de compressão e os últimos ciclos) foi mais evidente na semana 2 (Fig. 35B).

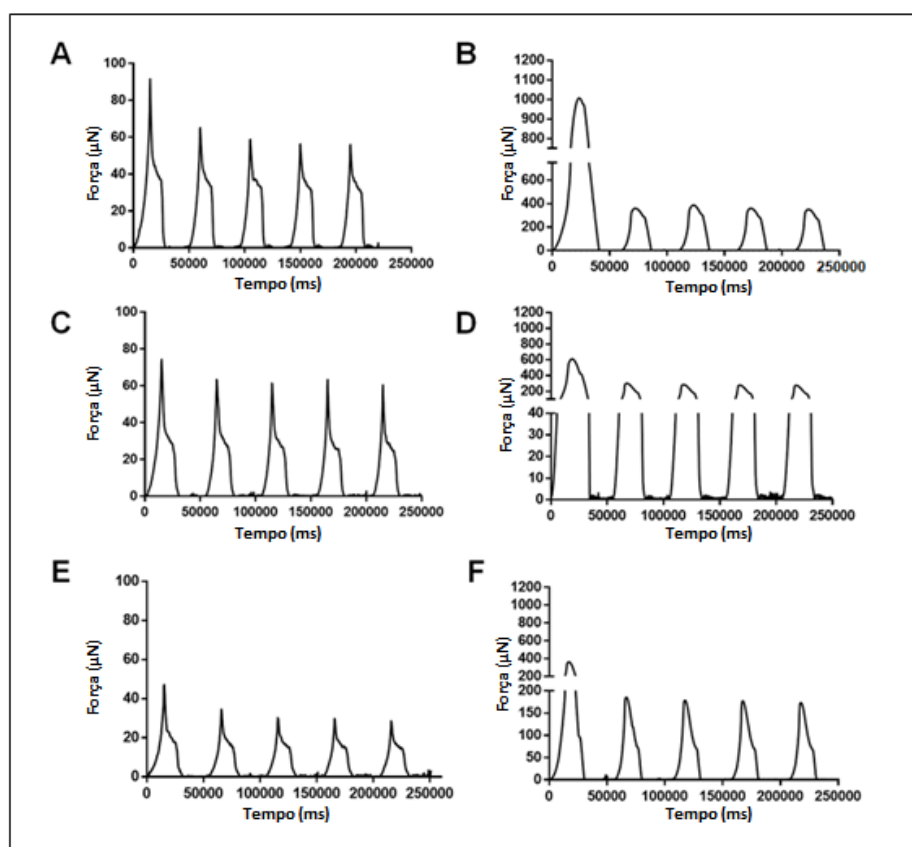


Figura 35: Os esferoides induzidos mudaram de comportamento plástico para viscoelástico durante os ciclos de compressão. Cada ciclo (total de 5) representado nos gráficos consiste em uma fase de compressão de até 25% do diâmetro do esferoide inicial (15 s), uma fase de espera (10 s), uma fase de recuperação (15 s) e uma fase de

repouso em que nenhuma força é aplicada (40 s). O segundo ciclo dos esferoides induzidos diminuiu em pelo menos 50% em sua resistência (B, D, F). (A, B) 2 semanas; (C, D) 3 semanas; (E, F) 5 semanas. (A, C, E) Esferoides não induzidos; (B, D, F) Esferoides induzidos. Ms: milissegundos.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCS NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO NÃO INDUTOR

5.4.1 Os esferoides induzidos apresentam uma cinética de fusão diferente dos esferoides não induzidos ao longo das semanas de cultivo

Os quartetos de esferoides induzidos para a via osteogênica apresentam uma cinética do processo de fusão diferenciada quando comparada com os esferoides não induzidos, ao longo das semanas de cultivo analisadas (Figs. 36, 37 e 38).

Após duas semanas de cultivo de indução osteogênica dos esferoides, os quartetos de esferoides não induzidos submetidos ao processo de fusão iniciaram o processo de fusionamento após 24h (Fig. 36C) e concluíram completamente esse processo ao final de 7 dias (Fig. 36F). Os esferoides induzidos iniciaram efetivamente a fusão em 24h (Fig. 36I), porém ao final de 7 dias, não estavam completamente fusionados como os não induzidos (Fig. 36L).

Após três semanas de cultivo de indução osteogênica dos esferoides, os quartetos de esferoides não induzidos submetidos ao processo de fusão iniciaram o processo de fusionamento após 24h (Fig. 37C) e ao final de 7 dias, não se encontraram completamente fusionados (Fig. 37F) como o observado em duas semanas (Fig. 37C). Os esferoides induzidos iniciaram o processo de fusão em 24h (Fig. 37I), porém ao final de 7 dias, não estavam completamente fusionados em uma única estrutura (Fig. 37L).

Por fim, em cinco semanas de cultivo de indução osteogênica dos esferoides, os quartetos de esferoides não induzidos submetidos ao processo de fusão também iniciaram o processo de fusionamento após 24h (Fig. 38C), porém, ao final de 7 dias, não se encontraram completamente fusionados (Fig. 38F), menos inclusive do que foi observado em três semanas (Fig. 38C). Os esferoides induzidos iniciaram o processo de fusão em 24h (Fig. 38I), porém ao

final de 7 dias, não estavam completamente fusionados em uma única estrutura (Fig. 38L), o que foi muito similar ao observado em três semanas (Fig. 38L).

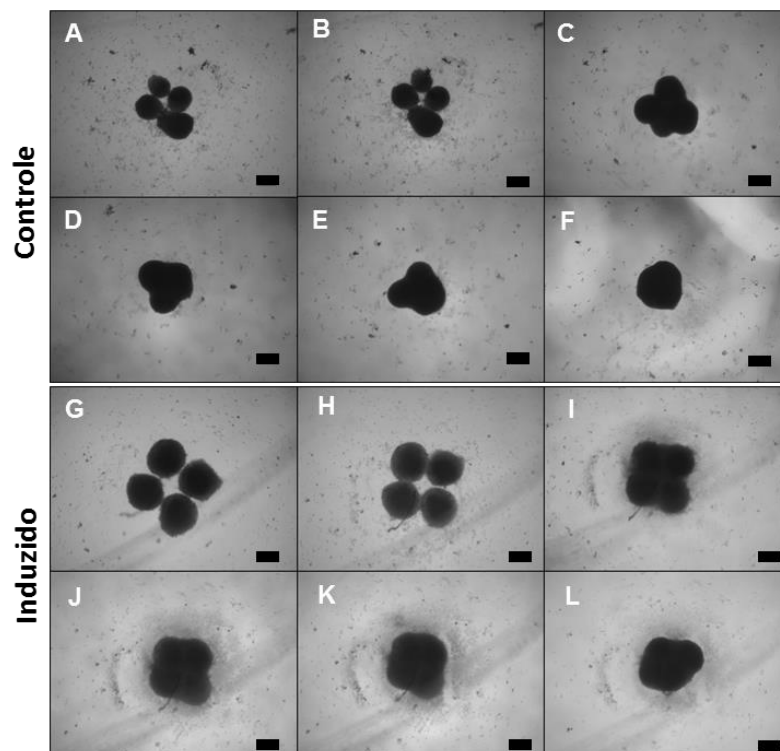


Figura 36: Processo de fusão *in vitro* dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após duas semanas de indução osteogênica dos esferoides. Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides não induzidos após 0 h (A), 3 h (B), 24 h (C), 2 dias (D), 3 dias (E) e 7 dias (F). Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides induzidos após 0 h (G), 3 h (H), 24 h (I), 2 dias (J), 3 dias (K) e 7 dias (L). Barra de aumento: 220 μm .

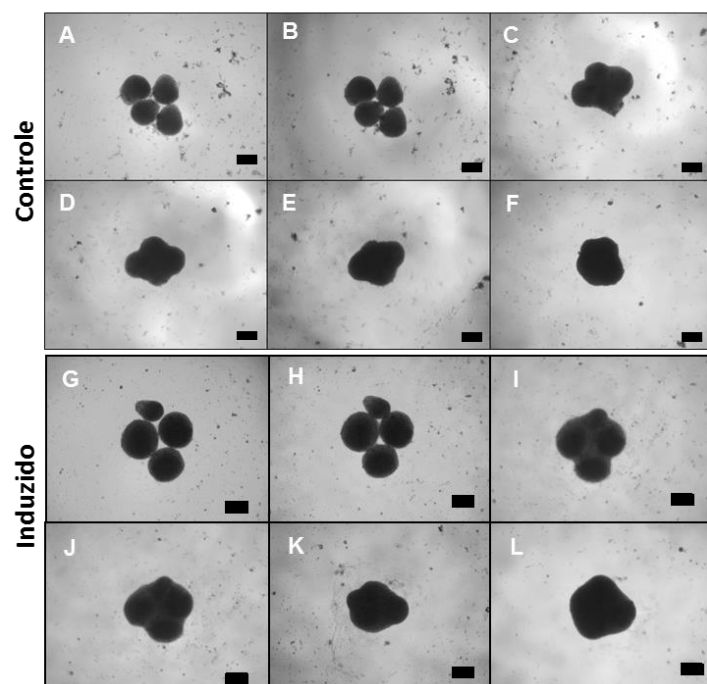


Figura 37: Processo de fusão *in vitro* dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após três semanas de indução osteogênica dos esferoides. Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides não induzidos após 0 h (A), 3 h (B), 24 h (C), 2 dias (D), 3 dias (E) e 7 dias (F). Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides induzidos após 0 h (G), 3 h (H), 24h (I), 2 dias (J), 3 dias (K) e 7 dias (L). Barra de aumento: 220 μm.

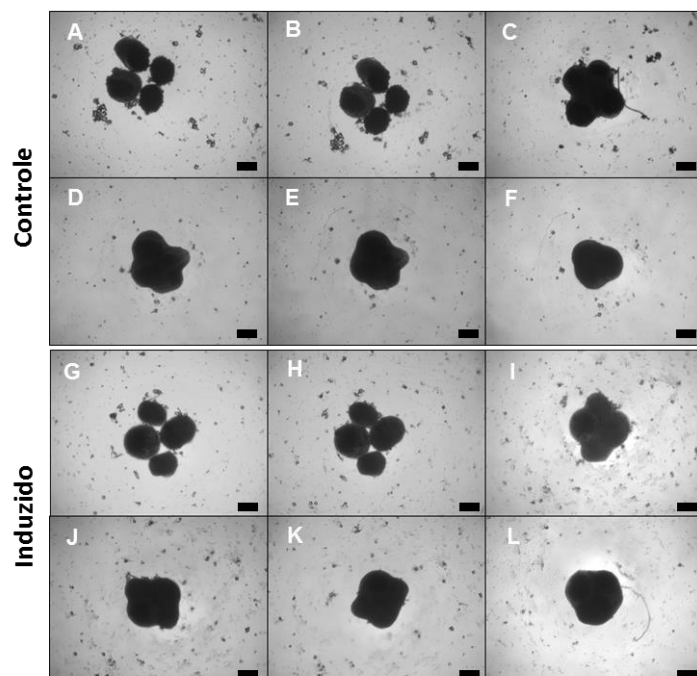


Figura 38: Processo de fusão *in vitro* dos quartetos de esferoides não induzidos e induzidos após cinco semanas de indução osteogênica dos esferoides. Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides não induzidos após 0 h (A), 3 h (B), 24 h (C), 2 dias (D), 3 dias (E) e 7 dias (F). Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides induzidos após 0 h (G), 3 h (H), 24 h (I), 2 dias (J), 3 dias (K) e 7 dias (L). Barra de aumento: 220 μm.

5.4.2 Os esferoides fusionados apresentam uma alta viabilidade celular

A fim de avaliar a viabilidade celular dos quartetos de esferoides não induzidos ao final do processo de fusão, foi realizada análise por kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD*®. Foi observada uma alta intensidade de marcação de células vivas, em verde, o que demonstra a atividade de calceína citoplasmática (Fig. 39A). Foi possível visualizar a presença de células mortas em vermelho, demonstrando a marcação do homodímero de etídio, em áreas na periferia dos esferoides fusionados e também no interior da fusão (Fig. 39A seta).

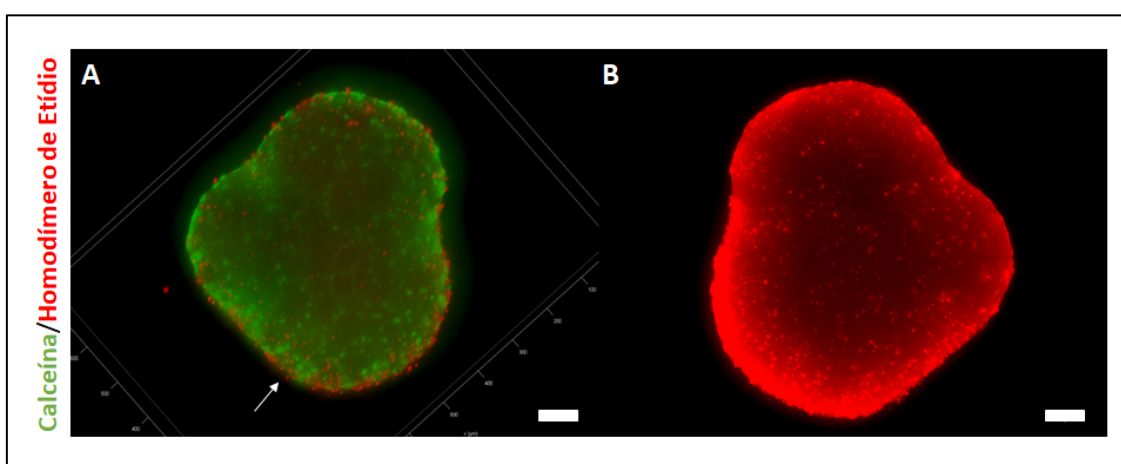


Figura 39: Viabilidade celular por kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD*® nos quartetos de esferoides não induzidos após 7 dias do processo de fusão. (A-B) Esferoides fusionados após 7 dias do início do processo de fusão. (A) Note células vivas marcadas para calceína em verde e a presença de células mortas marcadas em vermelho para Homodímero de Etídio na periferia (seta) e na região central dos esferoides fusionados. (B) Controle positivo de morte. Barra de aumento: 50 μ m.

5.4.3 Os dupletos de esferoides não induzidos e induzidos submetidos ao processo de fusão apresentam um comportamento de aproximação similar ao longo do período de fusão

A fim de ser possível calcular os diâmetros de contato e de aproximação (Fig. 40 M-R) dos esferoides não induzidos e induzidos durante o processo de fusão, estes foram posicionados em dupletos e fotografados durante o período de cultivo (Fig. 40 A-L).

A medição dos diâmetros conjugados e de contato (Fig. 40 M-R) revelou que esferoides não induzidos e induzidos durante o processo de fusão, ao longo

dos pontos de cultivo analisados, apresentam um comportamento de aproximação similar. Os esferoides não induzidos e induzidos organizados em dupletos, mostram claramente um aumento da área de contato (que corresponde ao diâmetro de contato), bem como uma pequena diminuição no comprimento total dos dupletos (o qual corresponde ao diâmetro conjugado) durante a fusão.

A principal diferença observada é que os esferoides não induzidos apresentam uma maior da área de contato, com um tamanho total de diâmetro de contato de 800 μm , ao longo da fusão e nos pontos de diferenciação analisados (Fig. 40 M, O e Q). Os esferoides induzidos apresentam uma menor área de contato durante a fusão, com um tamanho total de 1000 μm , em todos os pontos de diferenciação (Fig. 40 N, P e R).

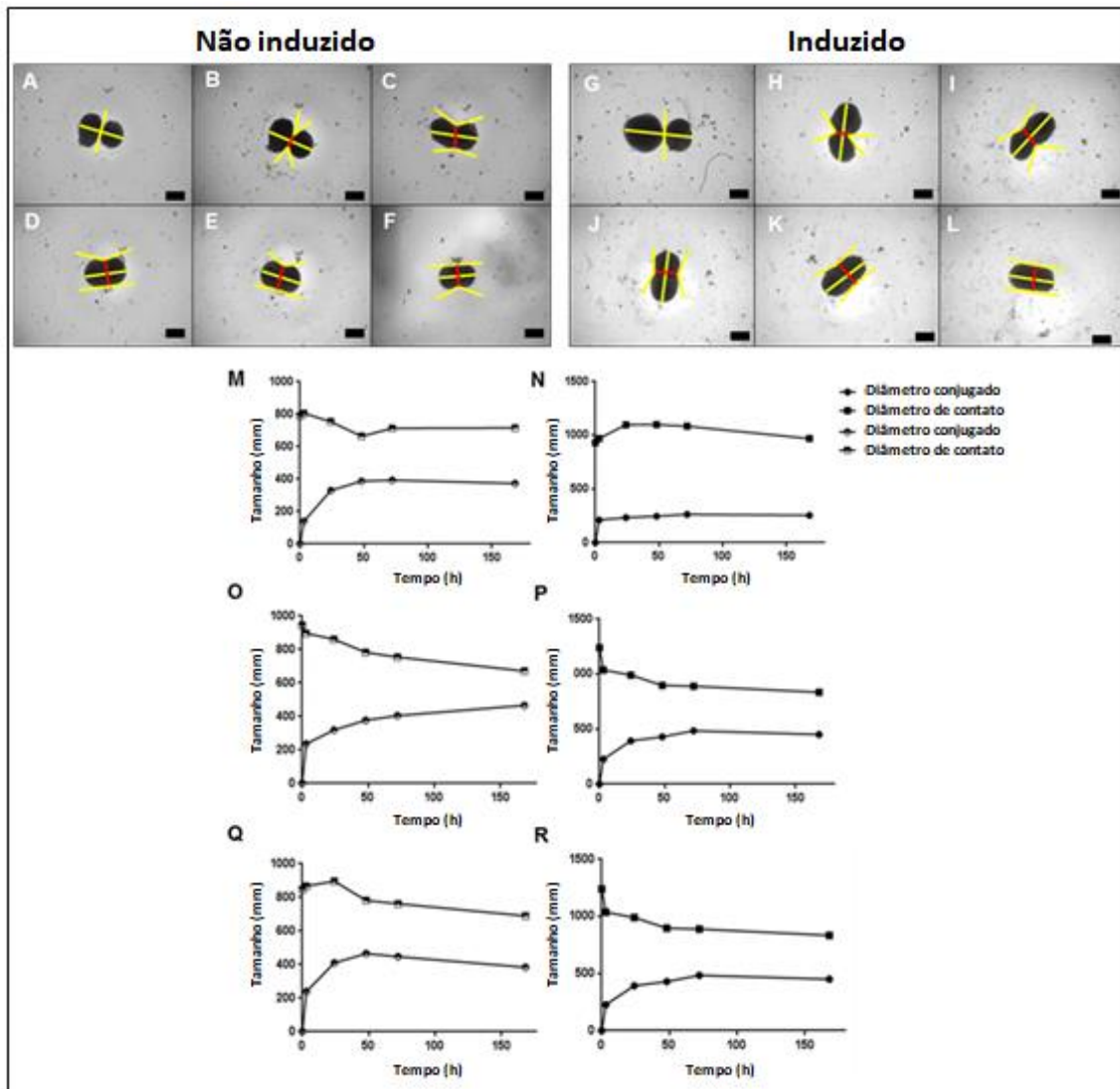


Figura 40: Os dupletos de esferoides não induzidos e induzidos apresentam baixa diferença no processo de fusão. Imagens de microscopia de contraste de fase dos

dupletos de esferoides não induzidos (A-F) e dos esferoides induzidos (G-L) após marcação de medição dos diâmetros no *software* Meazure™ 2.0. A linha amarela mostra o diâmetro conjugado (CD), a linha vermelha é o diâmetro de contato (CS). As linhas externas amarelas representam o ângulo de contato. Efeito comparativo da redução do diâmetro conjugado e do aumento do diâmetro da área de contato em esferoides de dupletos não induzidos (M, N e O) e induzidos (N, P e R). Barra de aumento: 220 µm.

5.4.4 Os quartetos de esferoides induzidos apresentam diferenças morfológicas ao final do processo de fusão

Com o objetivo de analisar a morfologia dos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas, três e cinco semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão, foi realizada inicialmente uma coloração com Hematoxilina e Eosina (Fig. 41).

As secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina mostraram que os quartetos de esferoides induzidos apresentam um mecanismo de fusão diferente a partir do ponto de três semanas de indução (Fig. 41 C, D). Após duas semanas de indução, as células dos esferoides, com um núcleo marcado intensamente com Hematoxilina, migraram em toda a área do quarteto de esferoides e houve uma fusão completa (Fig. 41 A, B). Foram observadas células com morfologia fibroblastóide na periferia dos esferoides fusionados (Fig. 41 A, B). Nos pontos de análise de três (Fig. 41 C, D) e cinco semanas (Fig. 41 E, F) de indução, os esferoides induzidos não se fusionam completamente e as células migram preferencialmente na área de interceptação da fusão (Fig. 41 C-F) (asterisco). Além disso, há uma reorganização da matriz extracelular no centro dos esferoides (seta).

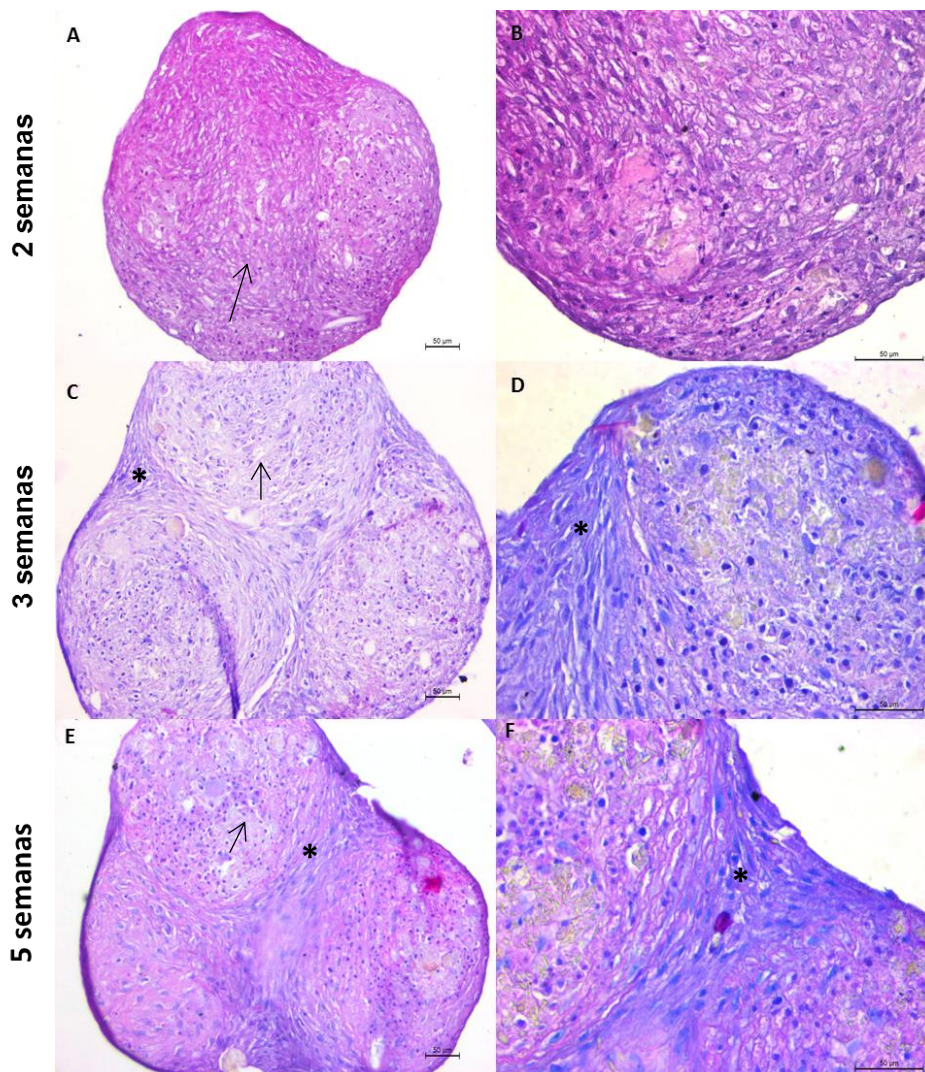


Figura 41: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão. Quartetos de esferoides induzidos fusionados referentes aos pontos de duas (A, B), três (C, D) e cinco semanas (E, F) de cultivo dos esferoides induzidos. Em duas semanas, os esferoides induzidos mantiveram uma maior capacidade de fusão total. Note uma fusão completa em (A) mediada pelas células (seta). Em três (B) e cinco semanas (C), os esferoides induzidos permaneceram em contato, porém não foi observada uma fusão completa. Observe uma reorganização da matriz extracelular nos esferoides induzidos em três (C, D) e cinco semanas (E, F) (seta), com uma elevada migração celular na área de contato da fusão (asterisco). Barra de aumento de 50 µm.

5.5 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS

5.5.1 Os esferoides induzidos apresentam maior marcação de depósitos de cálcio com a progressão do processo de fusão

Com o intuito de verificar a presença de depósitos de cálcio, um indício do processo de mineralização óssea, foi realizada a coloração por Alizarina vermelha nos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas, três e cinco semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão (Fig. 42).

No ponto de duas semanas de indução, houve a presença de depósitos de cálcio somente na periferia dos esferoides fusionados (Fig. 42 A-C). Para os esferoides fusionados referentes ao ponto de três semanas de indução, foi verificada a presença de depósitos de cálcio no interior dos esferoides, em áreas próximas à interseção da fusão (Fig. 42 D-F). Nos esferoides fusionados do ponto de cinco semanas de cultivo, é possível observar uma marcação mais intensa de Alizarina em uma região dos esferoides fusionados (Fig. 42 G) (seta) e em áreas de interseção da fusão (Fig. 42 H, I).

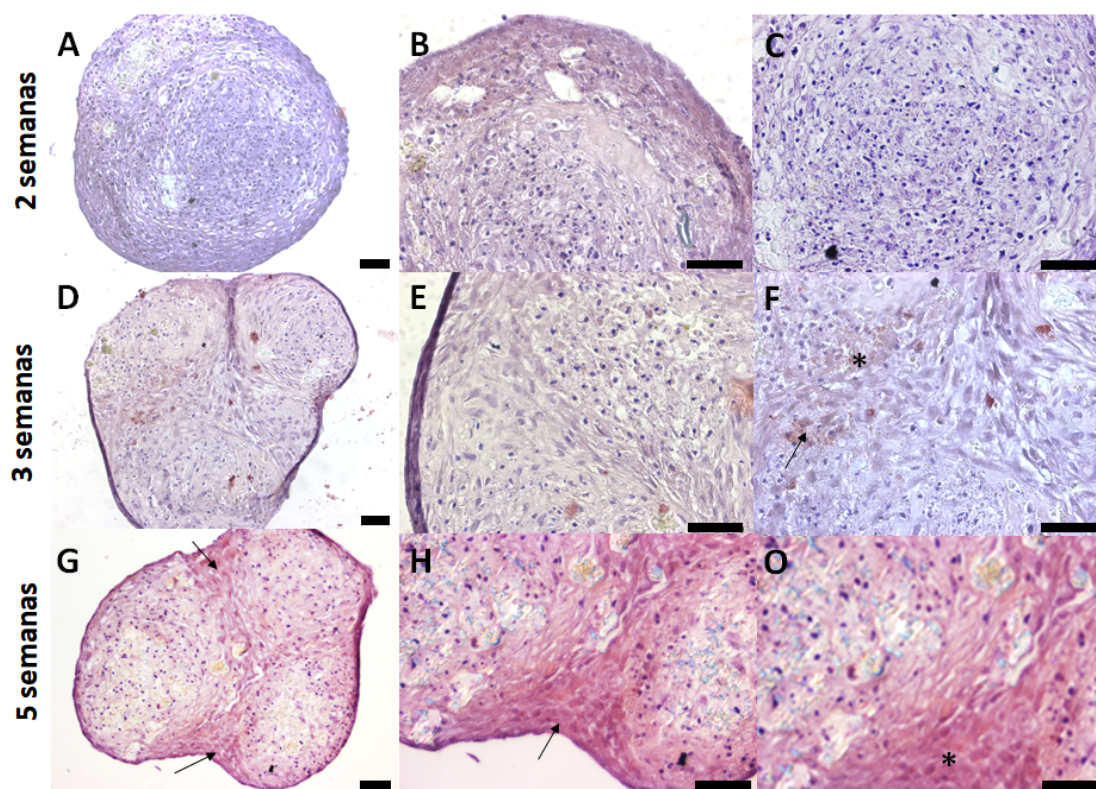


Figura 42: Coloração de Alizarina vermelha dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão. Quartetos de esferoides induzidos fusionados referentes aos pontos de duas (A-C), três (D-F) e cinco semanas (G-I) de cultivo dos esferoides induzidos. A coloração de Alizarina vermelha revelou a presença de depósitos de cálcio nos esferoides induzidos fusionados do ponto de duas semanas (A-C), principalmente na periferia (seta). No ponto de três semanas (D-F), note os depósitos na área de interseção da fusão (asterisco). Observe a maior intensidade de marcação em no ponto de cinco semanas (G-I) (seta) e na área de interseção da fusão (asterisco). Barra de aumento de 50 μ m.

5.5.2 Análise de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos fusionados

Com o objetivo de avaliar a presença de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas, três e cinco semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão, foram feitas análises de imunohistoquímica (Fig. 43).

No ponto de duas semanas, os esferoides induzidos fusionados foram positivos para colágeno do tipo I (Fig. 43D), apresentaram uma alta intensidade de N-caderina (Fig. 43A) e de osteocalcina (Fig. 43G), preferencialmente em áreas de interseção da fusão. No ponto de três semanas, a distribuição de colágeno I (Fig. 43E) e N-caderina (Fig. 43B) na matriz extracelular dos

esferoides induzidos fusionados, mostrou a mesma intensidade quando comparada à segunda semana. No entanto, os esferoides induzidos fusionados apresentaram uma maior intensidade à osteocalcina (Fig. 43H). No último ponto, o de cinco semanas, os esferoides induzidos fusionados apresentaram maior intensidade na distribuição de colágeno I (Fig. 43F) e osteocalcina (Fig. 43I) em toda a área dos esferoides. Não houve modificação da intensidade de marcação de N-caderina (Fig. 43C).

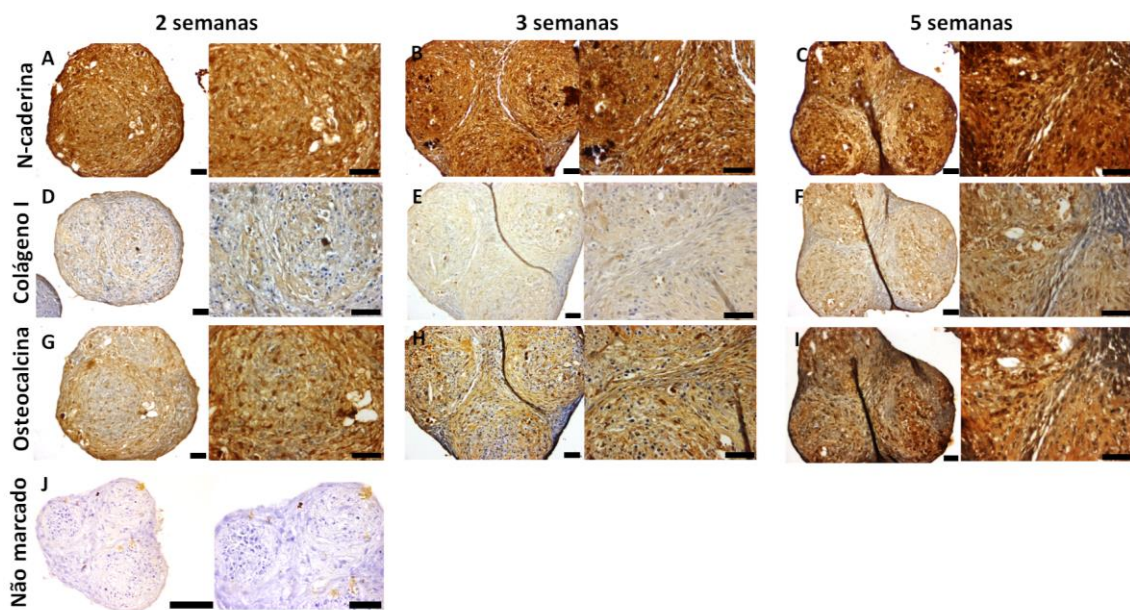


Figura 43: Composição de colágeno do tipo I, N-caderina e osteocalcina em quartetos de esferoides induzidos fusionados, ao longo dos pontos de cultivo, após 7 dias do processo de fusão. Quartetos de esferoides induzidos fusionados marcados para N-caderina referentes aos pontos de duas (A), três (B) e cinco (C) semanas de cultivo dos esferoides induzidos. Quartetos de esferoides induzidos fusionados marcados para Colágeno I referentes aos pontos de duas (D), três (E) e cinco (F) semanas de cultivo dos esferoides induzidos. Quartetos de esferoides induzidos fusionados marcados para osteocalcina referentes aos pontos de duas (G), três (H) e cinco (I) semanas de cultivo dos esferoides induzidos. (J) Não marcado. Barra de aumento de 50 μ m.

5.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO INDUTOR

5.6.1 Os esferoides induzidos em diferentes períodos de cultivo apresentam uma cinética de fusão similar em meio indutor osteogênico

Os quartetos de esferoides induzidos para a via osteogênica apresentam uma cinética do processo de fusão similar em meio indutor, ao longo das semanas de cultivo analisadas (Fig. 44).

Após duas e três semanas de cultivo de indução osteogênica dos esferoides, os quartetos de esferoides submetidos ao processo de fusão em meio indutor osteogênico, iniciaram o processo de fusionamento após 24h (Fig. 44 C, I), no entanto, ao final de 7 dias, não estavam completamente fusionados em uma única estrutura (Fig. 44 F, L).

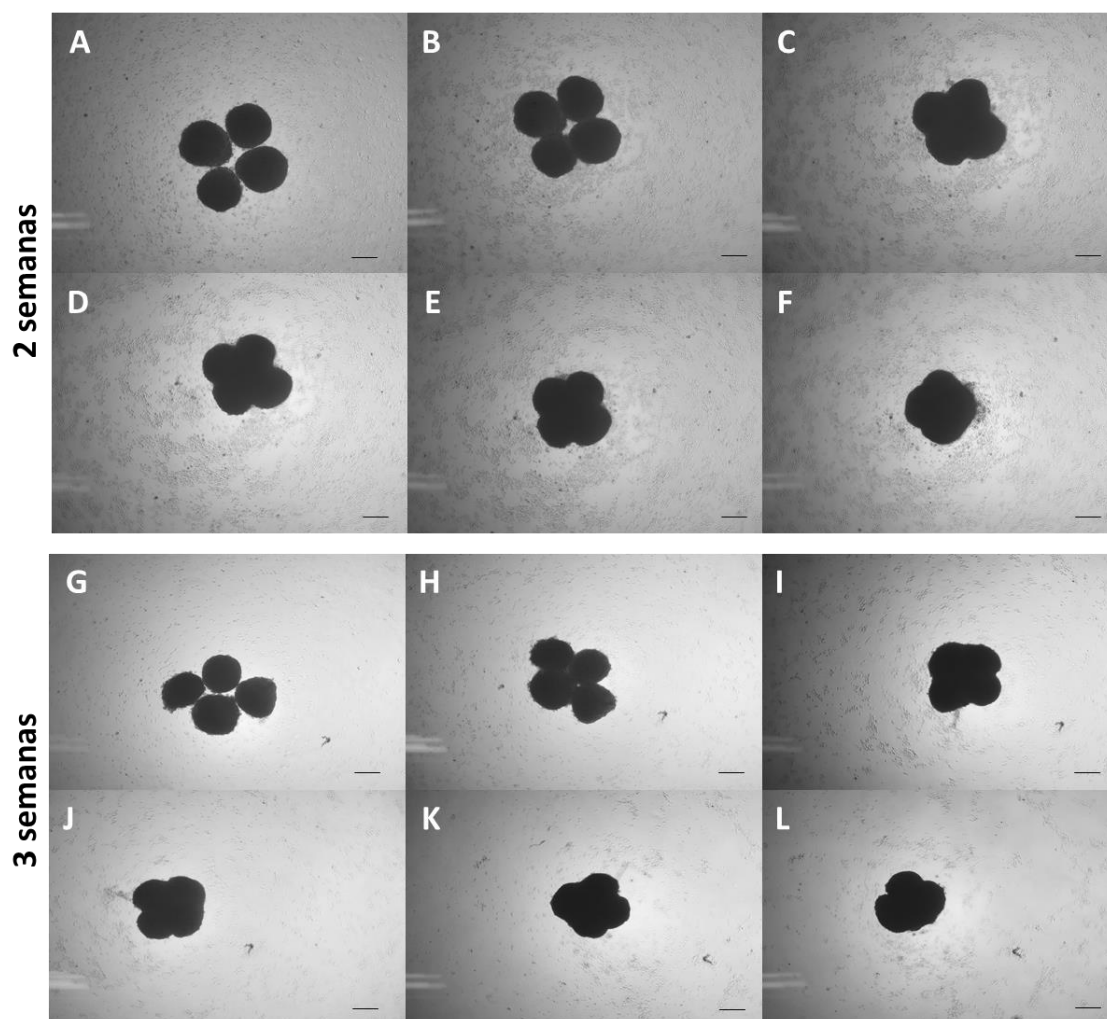


Figura 44: Processo de fusão *in vitro* em meio indutor dos quartetos de esferoides induzidos após duas e três semanas de indução osteogênica dos esferoides. Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides induzidos por duas semanas após 0 h (A), 3 h (B), 24 h (C), 2 dias (D), 3 dias (E) e 7 dias (F) do processo de fusão. Imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides induzidos por três semanas após 0 h (G), 3 h (H), 24 h (I), 2 dias (J), 3 dias (K) e 7 dias (L) do processo de fusão. Barra de aumento: 220 μ m.

5.6.2 Os dupletos de esferoides induzidos submetidos ao processo de fusão durante a indução não apresentam o mesmo comportamento de aproximação

A medição dos diâmetros conjugados e de contato (Fig. 45 M-P) revelou que os esferoides induzidos que foram cultivados em meio indutor durante a fusão, ao longo dos pontos de cultivo analisados, apresentaram um comportamento de aproximação similar no final do processo.

Os esferoides induzidos após duas semanas de cultivo organizados em dupletos mostraram claramente um maior aumento da área de contato (que corresponde ao diâmetro de contato), bem como uma pequena diminuição no comprimento total dos dupletos (o qual corresponde ao diâmetro conjugado) para 400 mm em 50 h (Fig. 45M)

Os esferoides induzidos após três semanas de cultivo organizados em dupletos apresentaram um aumento da área de contato, bem como uma pequena diminuição no comprimento total dos dupletos para 500 mm somente em 72 h do período de fusão, o que evidencia uma maior resistência ao processo de fusão quando comparado aos esferoides cultivados por duas semanas em meio indutor (Fig. 45N).

Em relação aos ângulos de contato entre os esferoides organizados em dupletos, os esferoides cultivados por duas e três semanas em meio indutor apresentaram um comportamento similar durante o processo de fusão (Fig. 45 O-P).

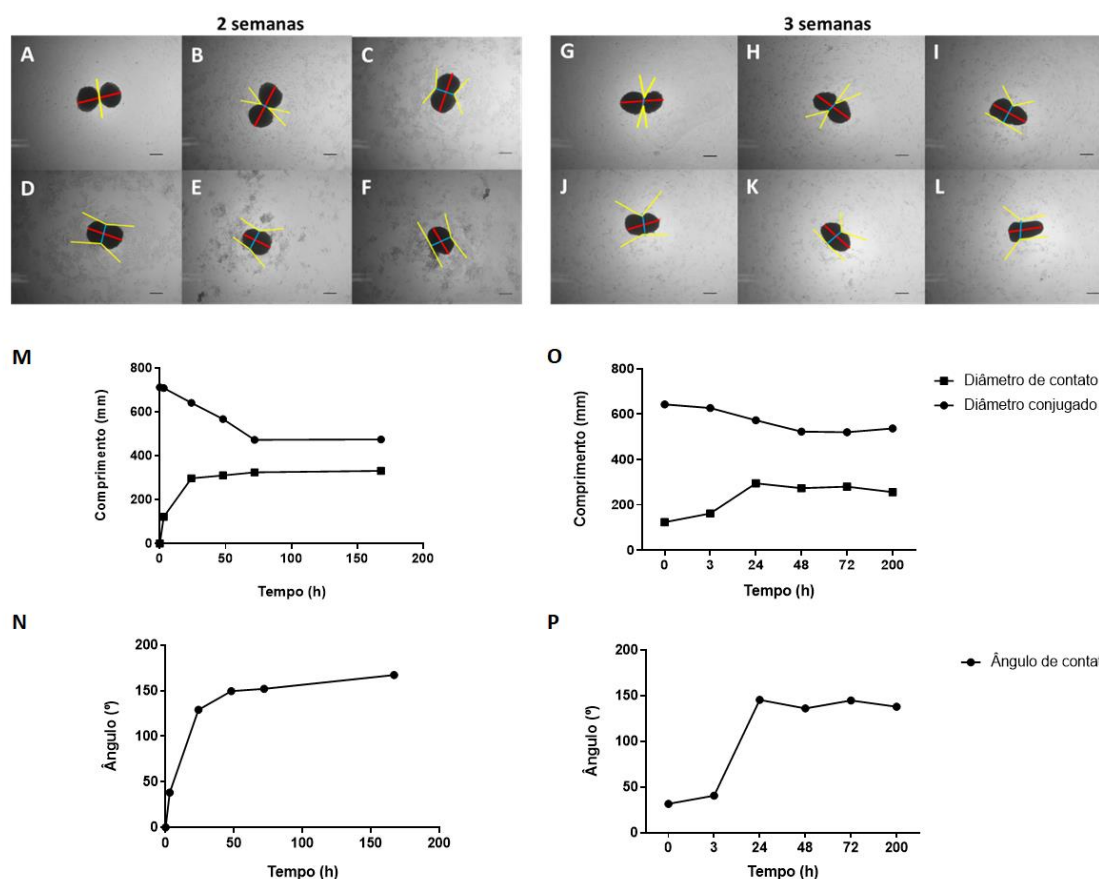


Figura 45: Os dupletos de esferoides induzidos cultivados por duas e três semanas apresentam diferença no processo de fusão em meio indutor. Imagens de microscopia de contraste de fase dos dupletos de esferoides induzidos cultivados por duas (A-F) e três (G-L) semanas após marcação de medição dos diâmetros no *software* Meazure™ 2.0. A linha azul mostra o diâmetro conjugado (CD), a linha vermelha é o diâmetro de contato (CS). As linhas externas amarelas representam o ângulo de contato. Efeito comparativo da redução do diâmetro conjugado e do aumento do diâmetro da área de contato em esferoides cultivados por duas (M, O) e três (N, P) semanas organizados em dupletos. Barra de aumento: 220 μ m.

5.6.3 Os quartetos de esferoides induzidos apresentam diferenças morfológicas ao final do processo de fusão

Com o objetivo de analisar a morfologia dos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas e três semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão em meio indutor, foi realizada inicialmente uma coloração com Hematoxilina e Eosina (Fig. 46).

As secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina mostraram que os quartetos de esferoides induzidos não se fusionaram completamente (Fig. 46 A-D) e as células migraram preferencialmente na área de interceptação da fusão em três semanas (Fig. 46C) (seta).

Os esferoides induzidos por três semanas, apresentaram uma marcação mais intensa de Hematoxilina após o período de fusão e na periferia, foi possível observar a presença de mais células com a morfologia fibroblastóide (Fig. 46C, asterisco).

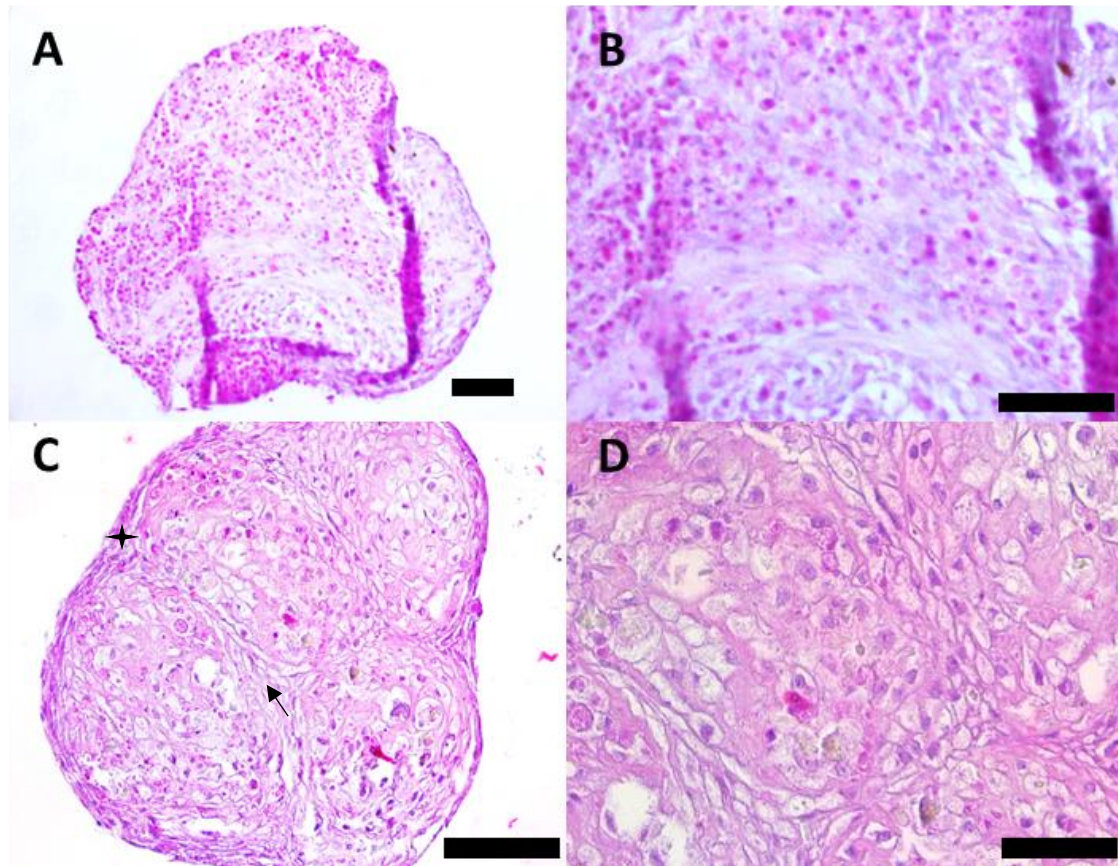


Figura 46: Coloração por Hematoxilina e Eosina dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor. Quartetos de esferoides induzidos fusionados em meio indutor referentes aos pontos de duas (A, B) e três (C, D) semanas de cultivo. Em duas (A, B) e três semanas (C, D), os esferoides induzidos permaneceram em contato, porém não foi observada uma fusão completa. Observe uma elevada migração celular na área de contato da fusão (seta) ao final de três semanas (D). Barra de aumento de 100 μm (A, C) e de 50 μm (B, D).

5.7 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS PARA A VIA OSTEOGÊNICA FUSIONADOS EM MEIO INDUTOR

5.7.1 Os esferoides apresentam similar marcação de depósitos de cálcio durante a fusão em meio indutor

Foi realizada a coloração por Alizarina vermelha nos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas e três semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão em meio indutor (Fig. 47).

De forma similar, nos pontos de duas e três semanas, houve a presença de depósitos de cálcio na periferia e na região central dos esferoides fusionados (Fig. 47 A-D, seta). Entretanto, no ponto de duas semanas, foi observada uma distribuição maior de depósitos de cálcio em toda a área dos esferoides (Fig. 47A).

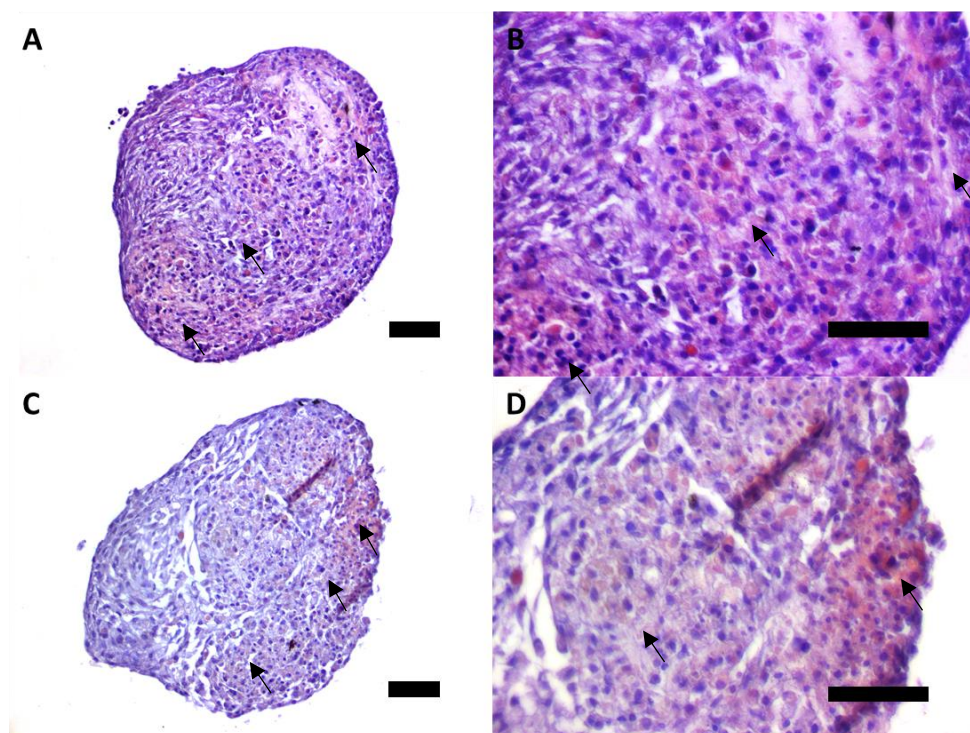


Figura 47: Coloração de Alizarina vermelha dos quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor. Quartetos de esferoides induzidos fusionados referentes aos pontos de duas (A, B) e três (C, D) semanas de cultivo dos esferoides induzidos. A coloração de Alizarina vermelha revelou a presença de depósitos de cálcio nos esferoides induzidos fusionados do ponto de duas (A, B) e três (C, D) semanas em áreas na periferia (seta) e no centro (seta) dos esferoides. Barra de aumento de 100 μm (A, C) e de 50 μm (B, D).

5.7.2 Análise de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos fusionados em meio indutor

Com o objetivo de avaliar a presença de moléculas de matriz extracelular nos quartetos de esferoides induzidos (pontos de duas e três semanas) submetidos por sete dias ao processo de fusão em meio indutor, foram feitas análises de imuno-histoquímica (Fig. 48) utilizando anticorpos para identificação de colágeno I (Fig. 48 A, B), colágeno X (Fig. 48 C, D), N-caderina (Fig. 48 E, F) e osteocalcina (Fig. 48 G, H).

No ponto de duas semanas, os esferoides induzidos fusionados foram negativos para colágeno I (Fig. 48A), apresentaram uma alta intensidade de colágeno X (Fig. 48C), baixa intensidade de marcação para N-caderina (Fig. 48E) e maior intensidade de distribuição de osteocalcina na área central (Fig. 48G), preferencialmente em áreas de interseção da fusão.

No ponto de três semanas, houve uma distribuição positiva de colágeno I, tanto na periferia como no centro dos esferoides fusionados (Fig. 48B). Em relação ao colágeno X (Fig. 48D) e N-caderina (Fig. 48F), houve uma distribuição em toda a área dos esferoides fusionados. A distribuição de osteocalcina ocorreu na periferia e no centro dos esferoides, porém com uma baixa intensidade de marcação (Fig. 48H).

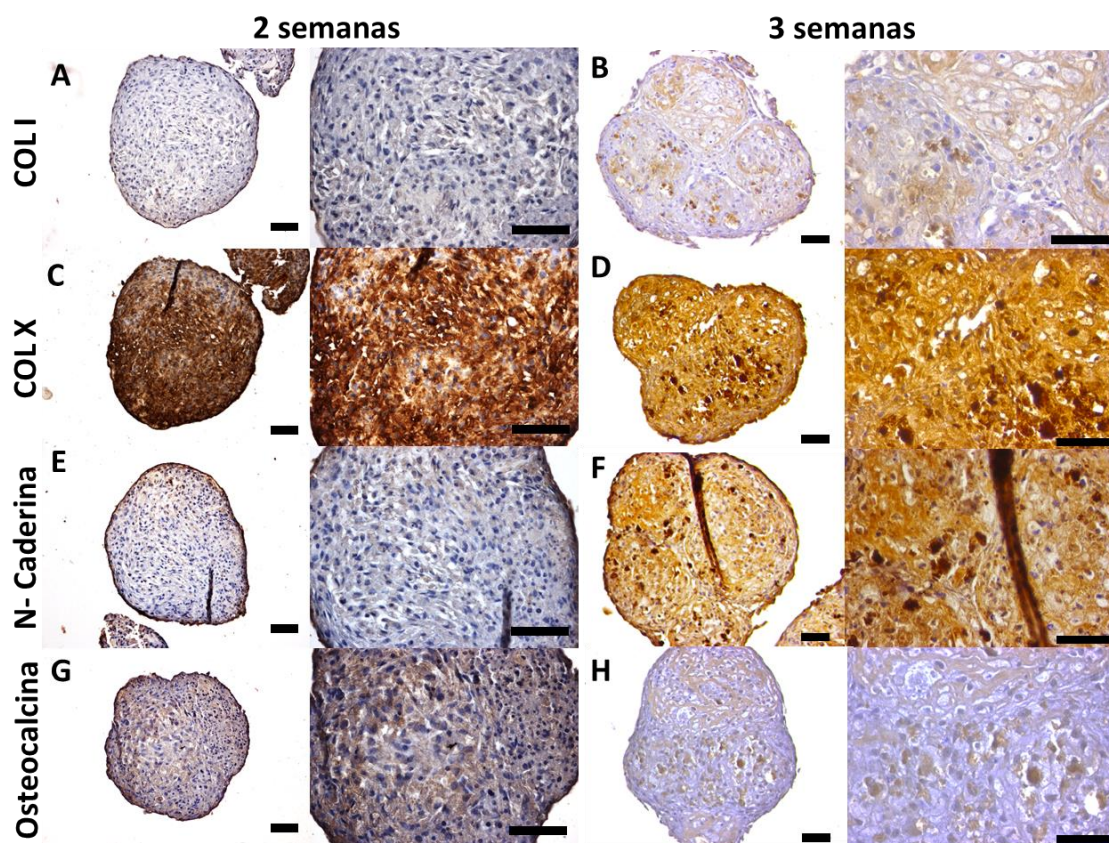


Figura 48: Composição de colágeno I, colágeno do tipo X, N-caderina e osteocalcina em quartetos de esferoides induzidos fusionados, após duas e três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor. Quartetos de esferoides induzidos fusionados marcados para (A) colágeno do tipo I, (C) colágeno do tipo X, (E) N-caderina e (G) osteocalcina referentes ao ponto de duas semanas. Quartetos de esferoides induzidos fusionados marcados para (B) colágeno do tipo I, (D) colágeno do tipo X, (F) N-caderina e (H) osteocalcina referentes ao ponto de três semanas. Barra de aumento de 50 μ m e 100 μ m.

5.7.3 Os esferoides apresentam diferenças no conteúdo elementar durante a fusão em meio indutor

A fim de avaliar a ultraestrutura celular e a presença de cristalização da matriz extracelular ao longo do período de cultivo durante a fusão em meio indutor, foram feitas análises por MET dos quartetos de esferoides induzidos dos pontos de duas e três semanas (Fig. 49 A, D). Além disso, com o intuito de verificar a presença ou ausência dos átomos de cálcio e fósforo, foi feito um mapeamento por microanálises de raio-X (EDX) nos cortes das amostras de esferoides processadas para MET (Fig. 49 B-C e E-F).

No ponto de duas semanas, não foi observada a presença de estruturas cristalinas, apenas uma maior densidade de fibras de matriz extracelular em

algumas regiões no centro dos esferoides (Fig. 49A, seta). O mapeamento elementar dos cortes revelou a presença de fósforo (Fig. 49B), porém não revelou a presença de cálcio (Fig. 49C).

No ponto de três semanas, foi observada a presença de estruturas similares à cristais nos cortes dos quartetos de esferoides fusionados (Fig. 49D, seta) e o mapeamento da região mostrou uma alta distribuição tanto de fósforo (Fig. 49E), como de cálcio (Fig. 49F).

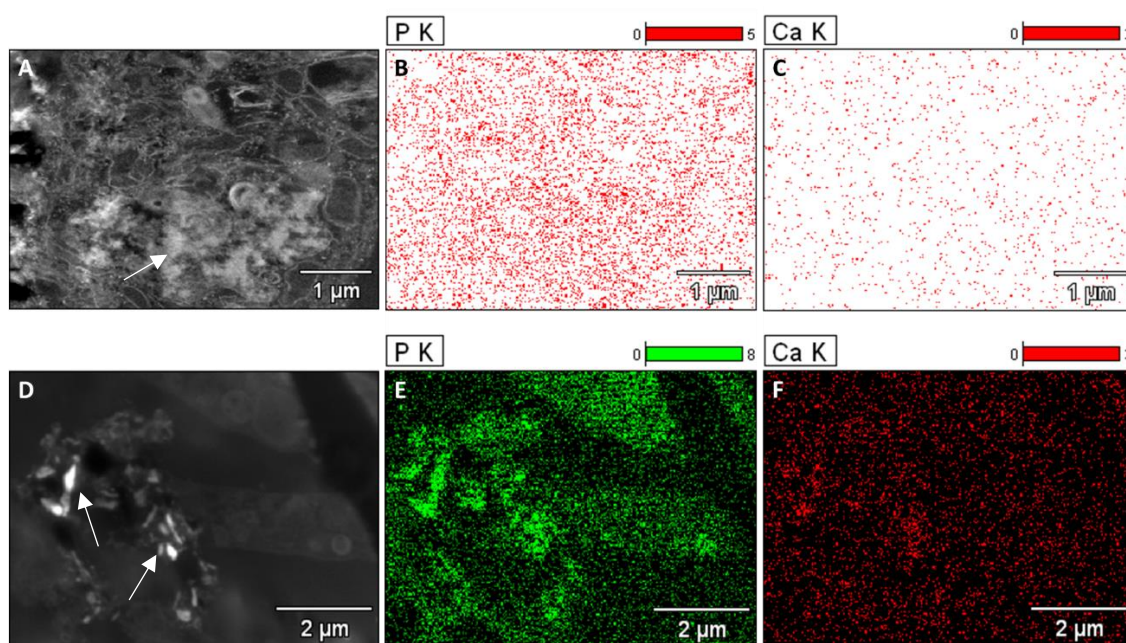


Figura 49: Presença de cristalização em quartetos de esferoides induzidos fusionados no ponto de três semanas de cultivo, após 7 dias do processo de fusão em meio indutor. Micrografias eletrônicas de transmissão representativas de esferoides induzidos nos pontos de duas (A) e três (D) semanas de cultivo. Observe a presença de fibras da matriz extracelular em quartetos de esferoides induzidos no ponto de duas semanas (A, seta branca). Note a presença de estruturas similares à cristais no interior dos quartetos de esferoides induzidos no ponto de três semanas (D, seta branca). Mapeamento elementar por energia por EDX dos quartetos de esferoides induzidos no ponto de duas semanas para (B) fósforo e (C) cálcio. Note a baixa distribuição de cálcio (C). Mapeamento elementar por energia por EDX dos quartetos de esferoides induzidos no ponto de três semanas para (E) fósforo e (F) cálcio. Note a alta distribuição de fósforo (E) e cálcio (F) nos esferoides do ponto de três semanas. Ca: cálcio, P: fósforo, K: potássio. Barra de aumento: A, B e C – 1 μm ; D, E e F – 2 μm .

5.8 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ESFEROIDES DE ASCs NÃO INDUZIDOS E INDUZIDOS SEMEADOS NOS ARCABOUÇOS 3D IMPRESSOS DE PLA e PLA/CHA

5.8.1 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado apresentam adesão à superfície do biomaterial

Os esferoides de ASCs não induzidos foram semeados no arcabouço de PLA a fim de analisar os eventos de migração e proliferação celular dos esferoides na superfície do biomaterial, além da morfologia das células após a semeadura (Fig. 50).

Após 7 dias em cultura, os esferoides aderiram à superfície do biomaterial e desencadearam o processo de fusão (Fig. 50 A e B, seta). Além disso, as células migraram para diferentes áreas na superfície do biomaterial (Fig. 50C), porém, não foi observada uma distribuição homogênea de células na área total do biomaterial. Em relação à morfologia, as células em sua maioria apresentaram um formato arredondado (Fig. 50F) e quando em direto contato com a superfície do biomaterial, apresentaram-se fibroblastóides (Fig. 50E, asterisco).

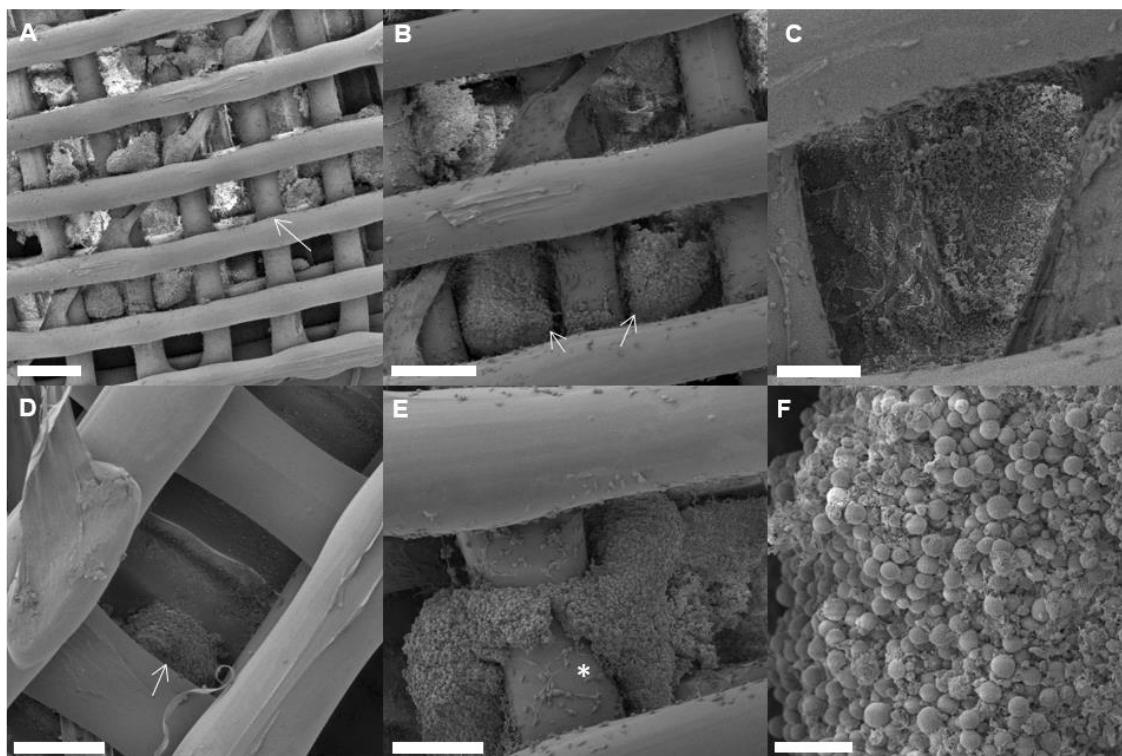


Figura 50: Micrografias eletrônicas de varredura de esferóides semeados em arcabouço de PLA após uma semana de cultura. Presença de esferóides na superfície do biomaterial (setas) (A). Os esferóides de ASC sofreram fusão (seta) após semeados no arcabouço de PLA e se dispersaram em diferentes áreas do arcabouço de PLA (B-D). Os esferóides de ASC, após fusão, espalharam-se na superfície do PLA e foram capazes de apresentar uma interação satisfatória com o arcabouço (E). Note que quando em contato direto com o arcabouço de PLA, as células apresentaram uma morfologia fibroblastóide (asterisco). (F) Ampliação da superfície de um esferoide fusionado na superfície do arcabouço de PLA. Observe a morfologia das células da superfície do esferoide de ASC predominantemente arredondadas. Barras de aumento: A, B – 500 μm ; C, D, E - 200 μm ; F – 50 μm .

5.8.2 Esferóides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 500 μm , menor número de camadas e aberto, apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial

Inicialmente, foi feita a semeadura dos esferóides de ASCs não induzidos no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com um maior espaçamento, um menor número de camadas, sendo a última, aberta. Com o objetivo de avaliar a interação e morfologia dos esferóides semeados no arcabouço, foram realizadas análises por MEV (Fig. 51).

Foi observado que uma vez na superfície do biomaterial, os esferóides interagiram entre si, desencadeando o processo de fusão (Fig. 51 B-H). Assim,

os esferoides apresentaram uma baixa adesão ao biomaterial, permanecendo em estado de fusão por todo o período de cultivo. Não foi possível notar nenhum evento de proliferação, adesão ou migração celular das células dos esferoides (Fig. 51 B-H).

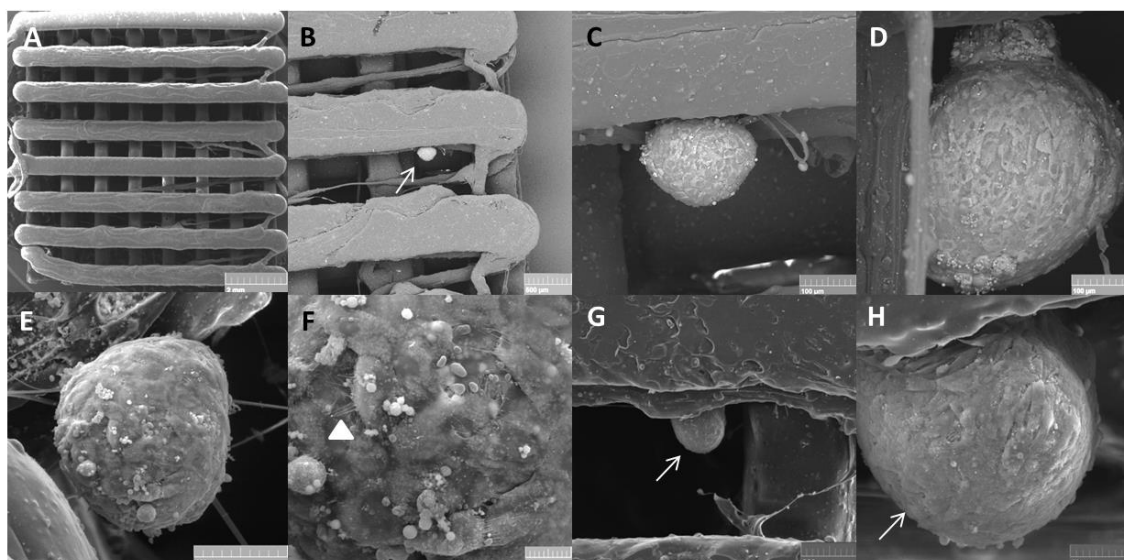


Figura 51: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA após semeadura dos esferoides não induzidos de ASCs. (A) Arcabouço 3D impresso de PLA/CHA. (B) Esferoide fusionado em uma área do biomaterial (seta). (C) Amplificação do esferoide fusionado apresentado em (B). (D, E) Esferoides fusionados em áreas diferentes do arcabouço. (F) Interações presentes no esferoide fusionado apresentado em (E) (cabeça de seta). (G, H) Esferoides fusionados em outra área da superfície do arcabouço (seta). Note pela amplificação em (H) a superfície do esferoide fusionado (seta). Barras de aumento: A – 2 mm; B – 500 μm ; C, D, E - 100 μm ; F – 20 μm ; G - 200 μm ; H – 50 μm .

5.8.3 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 μm , menor número de camadas e aberto, apresentam mudanças morfológicas e interação com o biomaterial

Em seguida, foi realizada a semeadura dos esferoides de ASCs não induzidos no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com o espaçamento de 400 μm e com um menor número de camadas, sendo a última, aberta. A fim de avaliar a interação e morfologia dos esferoides semeados no biomaterial, foram realizadas análises de MEV (Fig. 52).

Foi observado que uma vez na superfície do biomaterial, os esferoides interagiram em algumas regiões e não fusionaram entre si (Fig. 52 B-H). Os

esferoides aderiram no biomaterial por interação e espraio das células dos esferoides com a superfície do biomaterial (Fig. 52C, E e F). Foi possível notar que algumas células com morfologia fibroblastóide migraram dos esferoides e aderiram em regiões da superfície do biomaterial (Fig. 52B, seta). Além disso, os esferoides, uma vez interagindo com a superfície do biomaterial, apresentaram modificações em sua morfologia inicial (Fig. 52 C, E e G) e alguns foram capazes inclusive de produzir filamentos que estariam auxiliando em sua adesão à superfície do biomaterial (Fig. 52H, cabeça de seta).

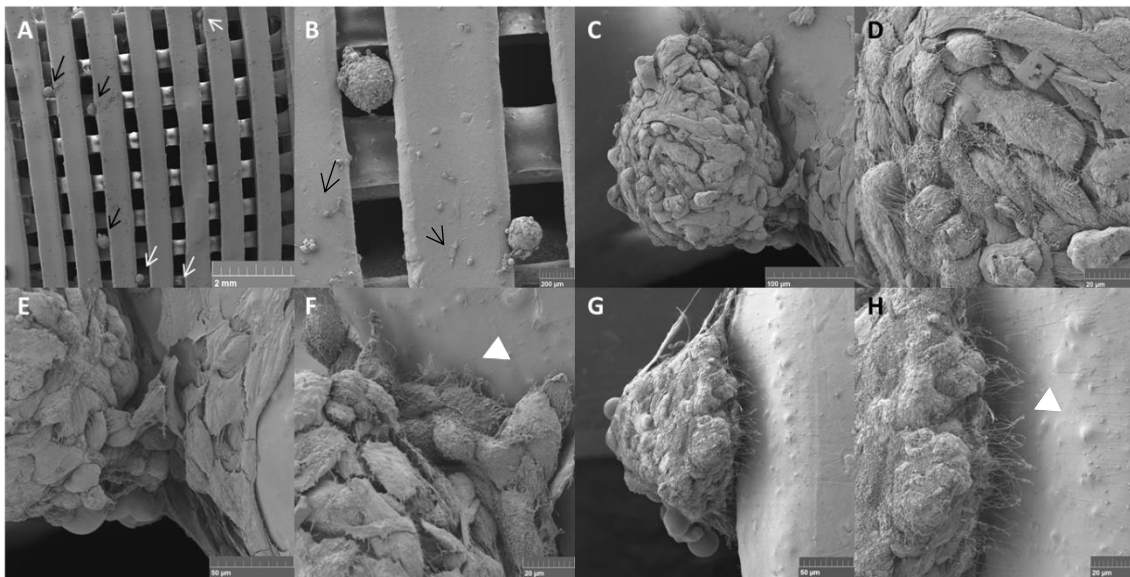


Figura 52: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com esferoides interagindo em sua superfície. Presença de esferoides na superfície do biomaterial (setas) (A). Em maior aumento, dois esferoides na superfície do arcabouço (B). Esferoide interagindo com o biomaterial. Notar as células do esferoide auxiliando na interação com a superfície do arcabouço (C). (D) Amplificação da morfologia celular do esferoide apresentado em (C). (E) Esferoide interagindo com o biomaterial. Notar as células do esferoide se espraio para auxiliar na interação com a superfície do arcabouço. (D) Amplificação das células do esferoide. Note a presença de filamentos para otimizar a interação com o biomaterial (cabeça de seta). (G) Um esferoide em outra área do biomaterial. Notar a mudança em sua morfologia para alcançar uma maior área de superfície do arcabouço e a presença de vesículas. (H) Em maior aumento, observe a presença de filamentos auxiliando na interação dos esferóides com o biomaterial (cabeça de seta). Barras de aumento: A – 2 mm; B – 200 μ m; C - 100 μ m; D - 20 μ m; E - 50 μ m; F – 20 μ m; G - 50 μ m; H – 20 μ m.

5.8.4 Esferoides de ASCs não induzidos semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado, apresentam mudança de morfologia, elevada interação com a superfície do biomaterial e alta migração celular

Por fim, foi realizada a semeadura dos esferoides de ASCs não induzidos no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com o espaçamento de 400 µm e com um maior número de camadas, sendo a última, fechada. A fim de avaliar a interação e morfologia dos esferoides semeados no biomaterial, foram realizadas análises por MEV (Fig. 53).

Foi observado que os esferoides interagiram de forma mais otimizada e em diferentes regiões da superfície do biomaterial (Fig. 53A-H). Foi possível notar que mesmo os esferoides se fusionando, houve uma elevada interação com o biomaterial (Fig. 53A). Além disso, um maior número de células com morfologia fibroblastóide migraram dos esferoides e aderiram em regiões da superfície do biomaterial (Fig. 53A). Os esferoides aderiram no biomaterial por interação e espraiamento das células dos esferoides com a superfície do mesmo (Fig. 53B e C). Essas células, em sua maioria, migraram de forma organizada para alcançar outras áreas do biomaterial (Fig. 53 B e C, seta). Além disso, as células dos esferoides apresentaram um tropismo de crescimento para certas regiões, de modo que apresentaram uma organização celular direcionada e secretaram componentes para a superfície do biomaterial (Fig. 53 D e E, seta).

Os esferoides, uma vez interagindo com a superfície do biomaterial, apresentaram modificações em sua morfologia inicial, de modo que se fusionaram completamente (Fig. 53F, cabeça de seta). Por fim, de acordo com a área do arcabouço, os esferoides além de se fusionarem para interagir, espraiaram-se na superfície, criando projeções celulares para outras regiões do biomaterial (Fig. 53 G e H, seta).

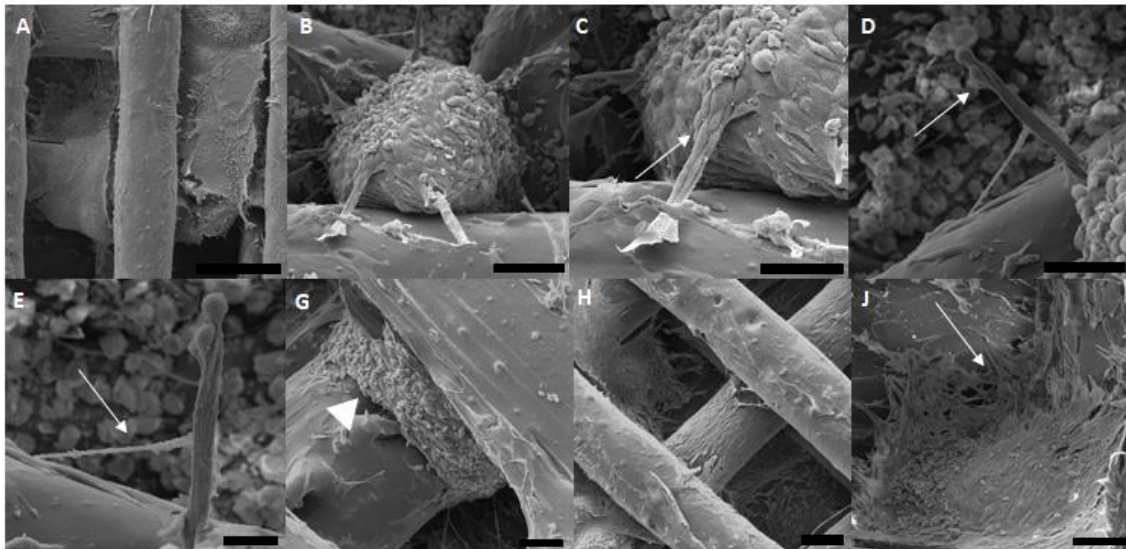


Figura 53: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma elevada interação dos esferoides na superfície e eventos de migração celular. Visualização macroscópica de uma área do arcabouço com esferoides fusionados e interagindo com o biomaterial. Note o elevado espreadimento de células na superfície do biomaterial (A). Observe um esferoide interagindo com diferentes áreas do biomaterial (B). Note no mesmo esferoide a presença de células com morfologia fibroblastóide (seta) migrando para o arcabouço de forma organizada (C). Observe um tropismo de crescimento das células para interagir com o arcabouço e a presença de componentes da matriz extracelular (seta) produzidos pelas células esferoides (D, E). Em outra área, observe um esferoide (cabeça de seta) com a morfologia completamente modificada para se fundir com o biomaterial (F). Observe a presença de células dos esferoides que migraram em toda a área do arcabouço (G). Um esferoide espreadido interagindo no arcabouço e células (seta) migrando em diferentes direções (H). Barras de aumento: A – 500 μm ; B – 100 μm ; C, D – 50 μm ; E – 20 μm ; F – 100 μm ; G – 200 μm ; H – 100 μm .

5.8.5 Esferoides de ASCs induzidos por 2 semanas semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 μm , maior número de camadas e fechado apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial

Foi observado que uma vez na superfície do biomaterial, os esferoides induzidos por 2 semanas não aderiram por completo e a maior parte dos esferoides semeados interagiu entre si, desencadeando o processo de fusão (Fig. 54 A-E). Assim, os esferoides apresentaram uma baixa adesão ao biomaterial, permanecendo em estado de fusão por todo o período de cultivo. Não foi possível notar eventos de proliferação, adesão ou migração celular das células dos esferoides induzidos na superfície do biomaterial (Fig. 54 A-E).

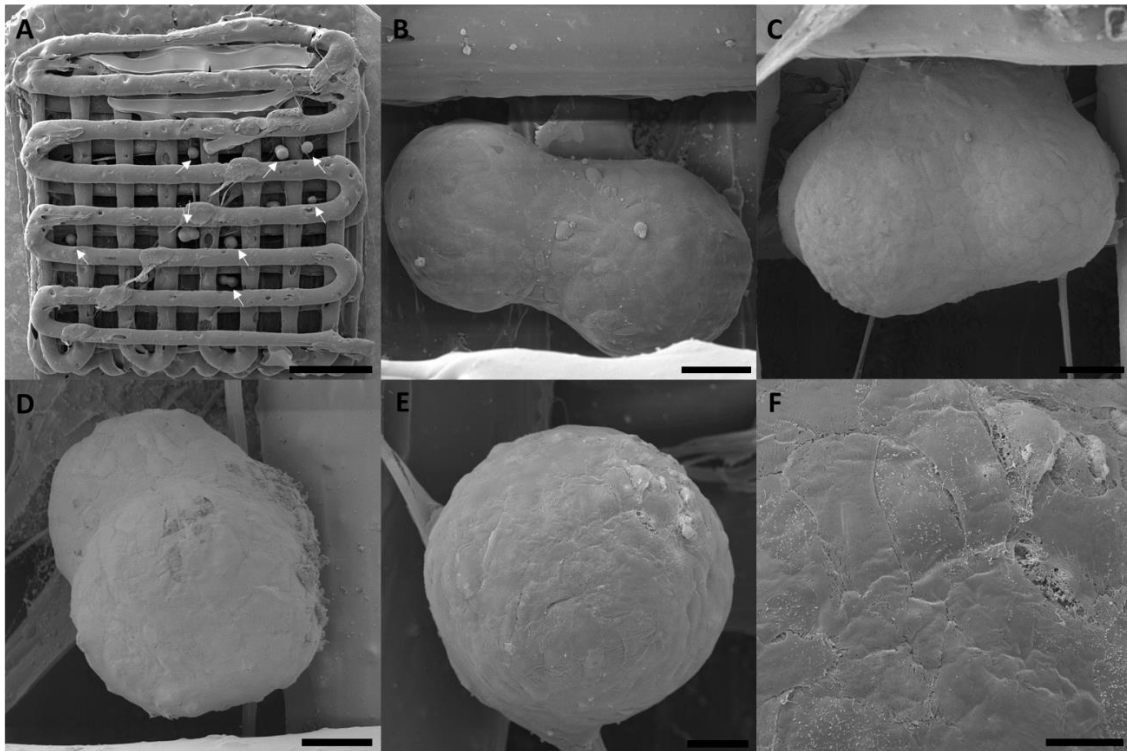


Figura 54: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma baixa interação dos esferoides induzidos por 2 semanas em meio condrogênico na superfície. (A) Visualização macroscópica de uma área do arcabouço com esferoides na superfície do biomaterial. (B-E) Esferoides fusionados em diferentes áreas do biomaterial. Note a ausência de espraiamento, migração ou proliferação das células dos esferoides. (F) Amplificação da morfologia de superfície do esferoide induzido fusionado. Barras de escala: A – 500 µm; B – 100 µm; C, D – 50 µm; E – 20 µm; F – 100 µm; G – 200 µm; H – 100 µm.

5.8.6 Esferoides de ASCs induzidos por 2 dias semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com espaçamento de 400 µm, maior número de camadas e fechado apresentam baixa interação com a superfície do biomaterial

Esferoides pré induzidos por 2 dias em meio indutor condrogênico foram semeados no arcabouço de PLA/CHA até totalizar o período de 2 semanas em cultivo.

Ao final do período de cultivo, os esferoides apresentaram uma alta interação com o arcabouço, como observado na figura 34. Os esferoides se fusionaram em praticamente toda a área do arcabouço (Fig. 55A, seta). Foi possível notar que as células apresentaram uma morfologia celular arredondada na superfície do biomaterial (Fig. 55 C-D, seta). Além disso, as células do esferoide foram capazes de se fusionar e interagir em diferentes regiões do

biomaterial (Fig. 55 E-F, seta) e inclusive secretar material extracelular em regiões diferentes (Fig. 55 G-H, seta).

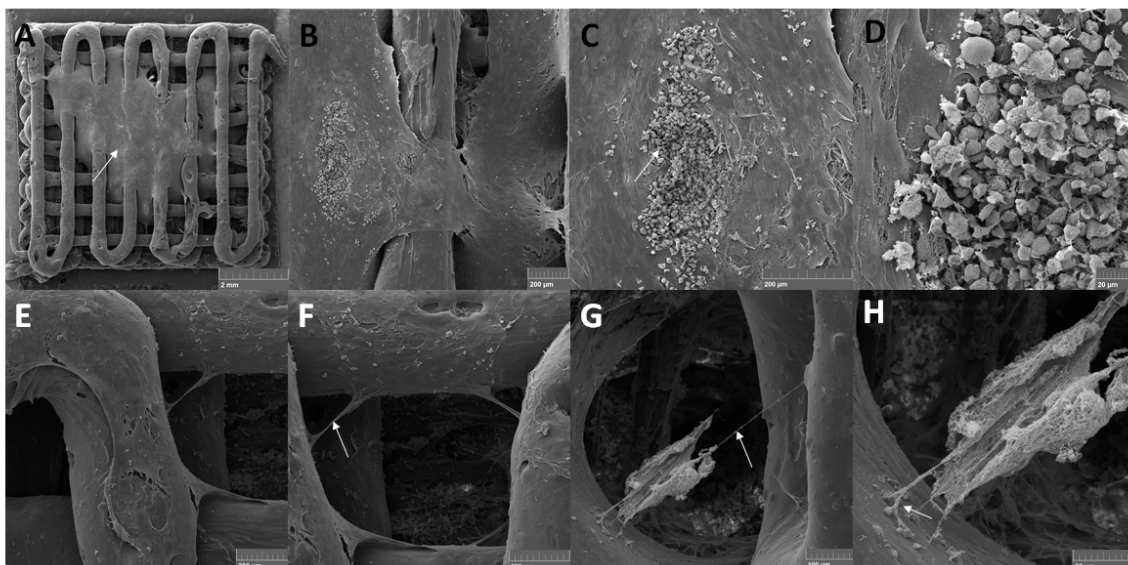


Figura 55: Microscopia eletrônica de varredura do arcabouço 3D impresso de PLA/CHA com uma alta interação dos esferoides induzidos por 2 dias em meio condrogênico na superfície. Visualização macroscópica de uma área do arcabouço com esferoides induzidos fusionados e interagindo com o biomaterial. Note o elevado espraio de células na superfície do biomaterial (A). Observe uma área do arcabouço em maior aumento, com um alto espraio dos esferoides induzidos (B). (C-D) Note que as células apresentaram uma morfologia arredondada na superfície do biomaterial. (E-F) Observe que as células do esferoide foram capazes de interagir em diferentes áreas do biomaterial (seta). Além disso, observe o alto espraio dos esferoides induzidos fusionados em áreas diferentes do arcabouço. (G-H) As células dos esferoides induzidos foram capazes de migrar e secretar material extracelular na superfície do biomaterial (setas). Barras de escala: A – 2 mm; B, C – 200 µm; D – 20 µm; E, F - 200 µm; G - 100 µm; H - 50µm.

5.8.7 Esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentam alta secreção de mediadores solúveis relacionados a angiogênese e osteogênese

A fim de analisar a resposta funcional dos esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados no arcabouço de PLA/CHA após 1 e 2 semanas de cultivo, foi realizado o ensaio de *MULTIPLEX*, para quantificação de mediadores solúveis secretados. Além disso, esse ensaio também foi realizado a fim de prever a resposta de secreção dos construídos quando *in vivo*. A partir da figura 56, é possível observar um *Heat Map* desta quantificação, onde foi possível detectar a presença de fatores de crescimento, interleucinas e

quimiocinas. Em destaque, após 1 semana de cultivo, foi observada uma elevada secreção de mediadores, para ambos os grupos, relacionados a osteogênese, como IL-6 e RANTES, e angiogênese, como VEGF e IL-8 (Fig. 56).

Os níveis de VEGF aumentaram significativamente (mais de 100x) para ambos os grupos após 2 semanas de cultivo (Fig. 56). Foi observada uma diferença estatística significativa no grupo de esferoides de ASC não induzidos semeados no arcabouço de PLA/CHA de 1 para 2 semanas e no grupo de esferoides de ASC induzidos a hipertrofia no mesmo período. No entanto, o grupo de esferoides de ASC induzidos apresentou o dobro de secreção de VEGF em 2 semanas, quando comparado ao não induzido.

Os níveis de IL-6 foram 10x mais elevados no grupo de esferoides de ASC não induzidos após 1 semana de cultivo, quando comparado ao induzido. Houve uma redução significativa após 2 semanas deste mediador para o grupo de esferoides não induzidos semeados no arcabouço e para os esferoides induzidos.

Os níveis de IL-8 foram elevados para ambos os grupos na primeira semana de cultivo sem diferença estatística significativa. Após 2 semanas, houve uma redução com diferença estatística significativa para esses mediadores e para ambos os grupos.

Os níveis de RANTES foram significativamente mais elevados no grupo de esferoides de ASC não induzidos semeados no arcabouço de PLA/CHA, quando comparado com o grupo de esferoides induzidos, após 1 semana de cultivo. Após 2 semanas, houve uma redução significativa para ambos os grupos nos níveis de secreção deste mediador.

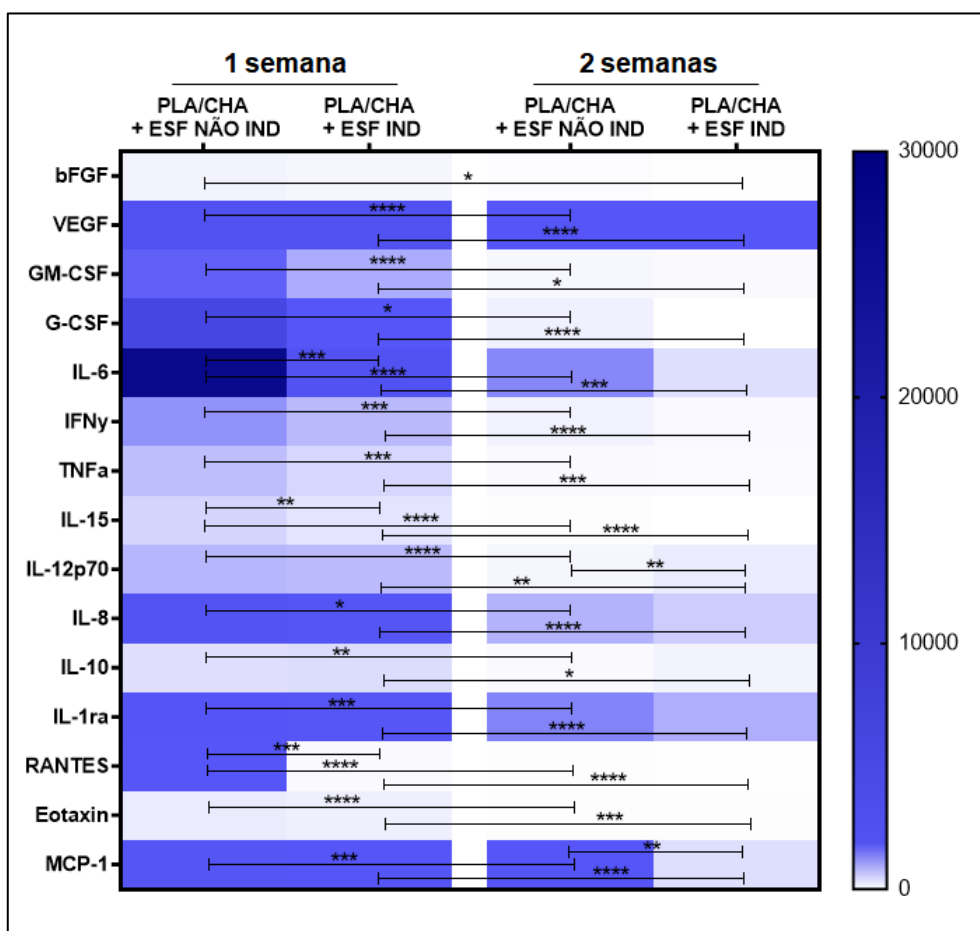


Figura 56: Esferoides não induzidos e induzidos para a via hipertrófica em arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentaram uma elevada secreção de mediadores relacionados à angiogênese e osteogênese. Heat-map da quantificação de mediadores solúveis secretados por esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados em arcabouço de PLA/CHA após 1 e 2 semanas de cultivo, realizado a partir do ensaio de *MULTIPLEX*. PLA/CHA (poli (ácido láctico)/carbonato apatita; IL-1ra (interleucina-1ra); IL-6 (interleucina-6); IL-8 (interleucina-8); IL-10 (interleucina-10); IL-12p70 (interleucina-12); IL-15 (interleucina-15); IFN- γ (interferon- γ); MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1); bFGF (fator básico de crescimento de fibroblastos); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); G-CSF (fator estimulador de colônias granulocitárias); GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos); TNF α (fator de necrose tumoral alfa). Os dados são expressos como média $\pm$ DP. Os asteriscos indicam valores de p obtidos por teste t múltiplo, o qual foi empregado a fim de analisar a diferença estatística entre as condições (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$).

5.9 CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO DE CALVÁRIA EM RATOS *Wistar*

Nos períodos de 1, 3 e 6 meses (Fig. 57, 58 e 59), foi possível observar no grupo coágulo (Fig. 57, 58 e 59 A-B) que o defeito foi preenchido por faixa estreita de tecido conjuntivo fibroso. Não foi observada a presença de infiltrado inflamatório e de osso neoformado na região central do defeito, apenas na periferia em continuidade com o tecido ósseo residente.

No grupo PLA/CHA, no período de 1 mês (Fig. 57 C-D e G-H) foi observada a presença de osso neoformado somente na região periférica do defeito (Fig. 57C, seta). Foi possível observar a presença de células similares a osteoblastos na região próxima do osso neoformado (Fig. 57 D e H, seta). No período de 3 meses (Fig. 58 C-D e I-J), foi observado que a área do defeito foi preenchida por lacunas compatíveis com a área do PLA/CHA implantado (Fig. 58C, seta). Além disso, foi observado osso neoformado (Fig. 58C, seta), tanto na periferia, como na porção central do defeito, por vezes circundando a área do biomaterial. No período de 6 meses (Fig. 59 C-D e G-H), foi observado osso neoformado (Fig. 59 C-D, setas) na área central do defeito, inclusive com a presença de osteoblastos (Fig. 59D, asterisco) circundando a área de tecido ósseo neoformado. Em nenhum período experimental foi observada a presença de infiltrado inflamatório.

No grupo PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados, após 1 mês de implante (Fig. 57 E-F e I-J), foi observada a formação de osso neoformado em regiões da periferia do defeito (Fig. 57E, seta), em direção a região central, com a presença de uma quantidade expressiva de vasos sanguíneos (Fig. 57I, asterisco). Em proximidade com o osso neoformado, também foi observada a presença de células similares a osteoblastos (Fig. 57F, seta). Além disso, foi observada a formação de uma alta quantidade de tecido fibroso. Após 3 meses (Fig. 58 E-F e K-L), a área do defeito foi preenchida por espaço de PLA/CHA entremeada com tecido conjuntivo fibroso e foi observada presença de osso neoformado na região central do defeito (Fig. 58 F e L, setas). Além disso, uma organização diferenciada de matriz extracelular pode ser observada na região central do defeito (Fig. 58 F e K, asterisco). Após 6 meses (Fig. 59 G-H e M-N), foi observada presença de osso com maior grau de maturidade na região central

do defeito (Fig. 59N). Em todos os períodos experimentais, houve ausência de infiltrado inflamatório.

No grupo PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia semeados, após 1 mês (Fig. 57 K-N), foi observada a presença de esferoides em proximidade à região virtual do biomaterial e em continuidade com tecido conjuntivo no centro do defeito (Fig. 57 K-L). Além disso, foi possível observar tecido ósseo neoformado em direção a região central do defeito (Fig. 57N). Após 3 meses (Fig. 58 G-H e M-N), foi observada a presença de uma área extensa de tecido ósseo neoformado na região central do defeito (Fig. 58N). Além disso, também foi possível observar tecido conjuntivo formado na mesma área (Fig. 58 M). Após 6 meses (Fig. 59 K-N), foi observado que os esferoides estavam localizados preferencialmente na região central do defeito (Fig. 59 K-L, seta). Foi observada uma área extensa de tecido ósseo neoformado (Fig. 59 M-N, seta) em direção a região central do defeito. Em todos os períodos experimentais, houve ausência de infiltrado inflamatório.

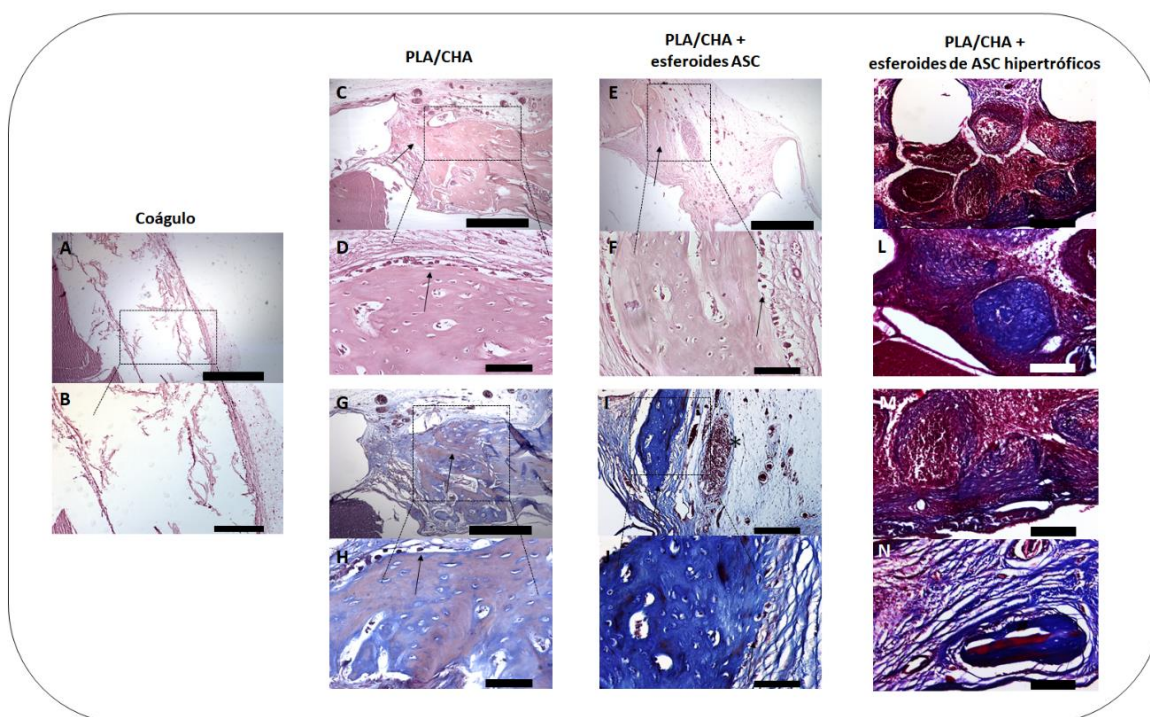


Figura 57: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao ensaio *in vivo* em defeito ósseo crítico de calvária em ratos *Wistar* após o período de 1 mês. Coloração de Hematoxilina e Eosina dos grupos (A, B) coágulo, (C, D) PLA/CHA e (E, F) PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados. Coloração de Tricômico de Masson dos grupos (G, H) PLA/CHA, (I, J) PLA/CHA com esferoides não induzidos

semeados e (K-N) PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia semeados. PLA/CHA: (poli (ácido láctico)/carbonato apatita. Barras de aumento: A – 500 μ m; B – 200 μ m; C – 500 μ m; D – 50 μ m; E – 500 μ m; F – 50 μ m; G – 500 μ m; H – 50 μ m; I – 500 μ m; J – 50 μ m; K, L – 200 μ m; M, N – 100 μ m.

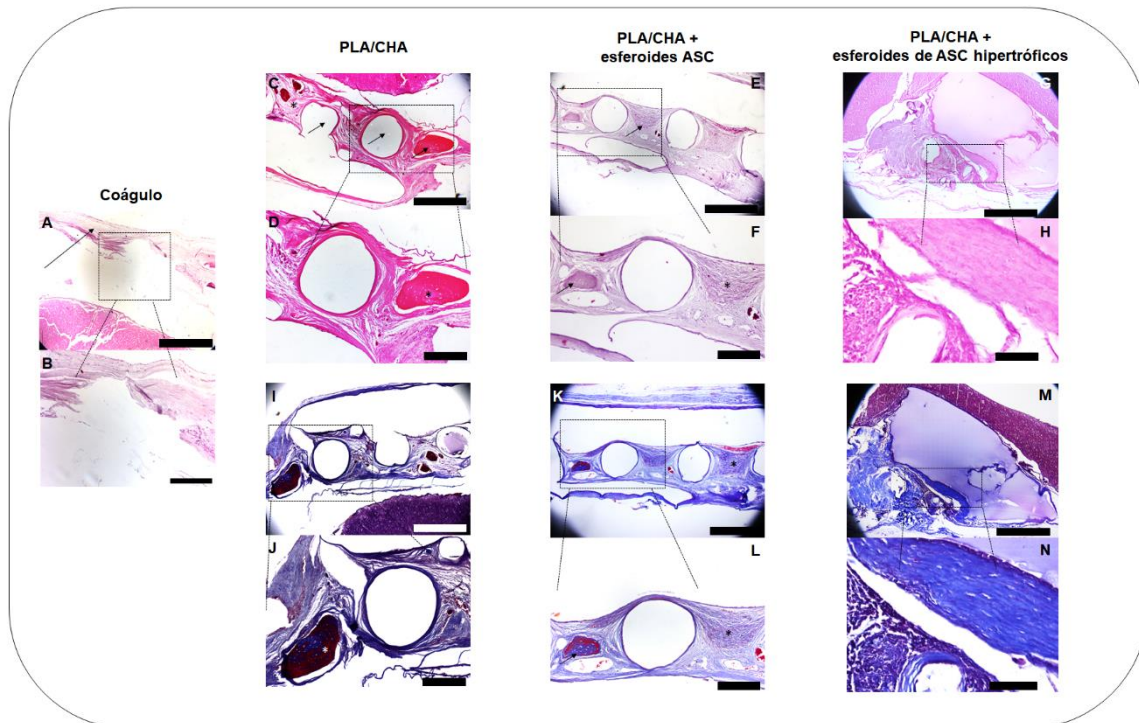


Figura 58: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao ensaio *in vivo* em defeito ósseo crítico de calvária em ratos *Wistar* após o período de 3 meses. Coloração de Hematoxilina e Eosina dos grupos (A, B) coágulo, (C, D) PLA/CHA, (E, F) PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados e (G, H) PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia semeados. Coloração de Tricômico de Masson dos grupos (I, J) PLA/CHA, (K, L) PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados e (M, N) PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia semeados. PLA/CHA: (poli (ácido láctico)/carbonato apatita. Barras de aumento: A – 500 μ m; B – 200 μ m; C – 500 μ m; D – 200 μ m; E – 500 μ m; F – 200 μ m; G – 500 μ m; H – 50 μ m; I – 500 μ m; J – 200 μ m; K – 500 μ m; L – 200 μ m; M – 500 μ m; N – 50 μ m.

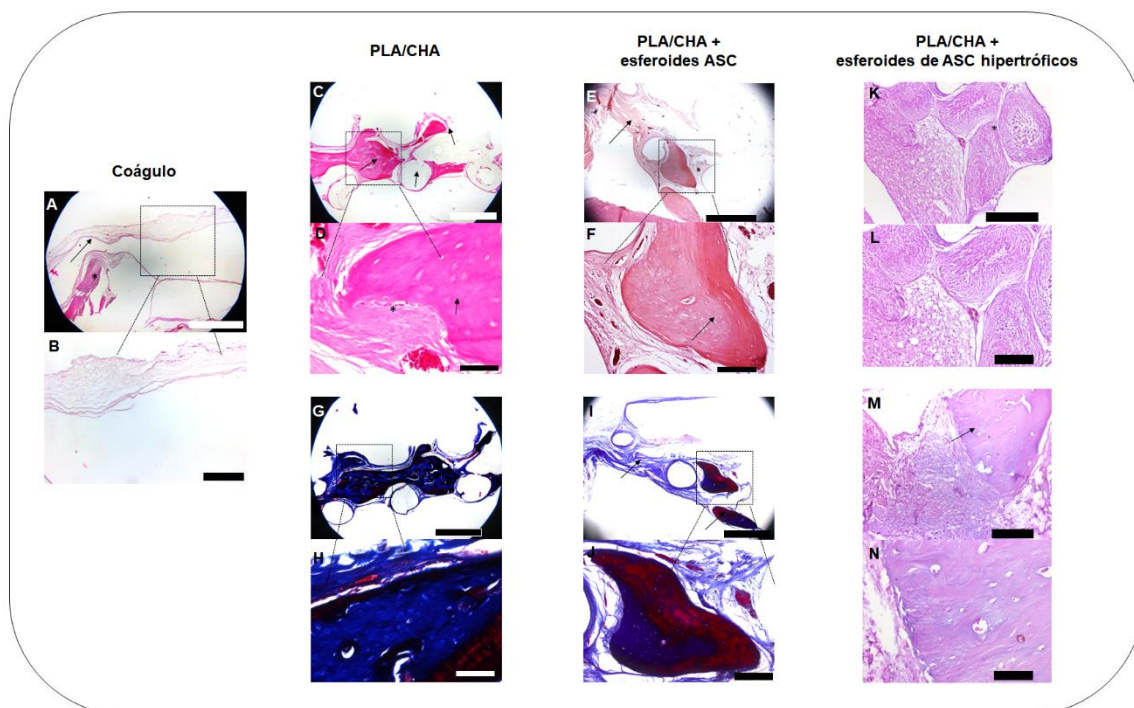


Figura 59: Coloração de Hematoxilina e Eosina e de Tricômico de Masson em amostras de coágulo, PLA/CHA, PLA/CHA com esferoides não induzidos e PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia, correspondentes ao ensaio *in vivo* em defeito ósseo crítico de calvária em ratos *Wistar* após o período de 6 meses. Coloração de Hematoxilina e Eosina dos grupos (A, B) coágulo, (C, D) PLA/CHA e (E, F) PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados. Coloração de Tricômico de Masson dos grupos (G, H) PLA/CHA e (I, J) PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados. (K-N) Coloração de Hematoxilina e Eosina do grupo PLA/CHA com esferoides induzidos a hipertrofia semeados. PLA/CHA: (poli (ácido lático)/carbonato apatita. A – 500 μ m; B - 200 μ m; C – 500 μ m; D – 50 μ m; E – 500 μ m; F – 200 μ m; G – 500 μ m; H – 50 μ m; I – 500 μ m; J – 100 μ m; K – 200 μ m; L – 100 μ m; M – 200 μ m; N – 50 μ m.

5.10 OS CONSTRUÍDOS CONTENDO ESFEROIDES DE ASCs INDUZIDOS A HIPERTROFIA APRESENTARAM MAIOR QUANTIDADE DE OSSO NEOFORMADO APÓS IMPLANTE

A partir da análise de histomorfometria, foi possível quantificar a área de osso neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo nos grupos implantados após os períodos de 1, 3 e 6 meses. Os resultados da quantificação foram apresentados em Log nos gráficos a seguir (Fig. 60).

Foi possível observar que o grupo contendo os esferoides de ASCs induzidos a hipertrofia semeados no arcabouço de PLA/CHA, apresentou um aumento progressivo da quantidade de osso neoformado ao longo dos períodos de 1, 3 e 6 meses. Esse aumento apresentou significância estatística quando

comparado ao grupo contendo somente o PLA/CHA, após 3 e 6 meses, e ao grupo com esferoides de ASCs não induzidos semeados no arcabouço de PLA/CHA, após 3 meses (Fig. 60A).

Houve uma redução da quantidade remanescente de biomaterial nos grupos implantados. Após o período de 3 meses, só foi possível quantificar o biomaterial remanescente no grupo PLA/CHA com esferoides de ASCs não induzidos semeados. Após 6 meses de implante, não foi possível quantificar a presença de biomaterial em nenhum dos grupos implantados (Fig. 60B).

Em relação a quantidade de tecido conjuntivo, foi observada uma redução em todos os grupos ao longo dos períodos experimentais. Essa redução foi maior no grupo PLA/CHA com esferoides de ASCs induzidos a hipertrofia semeados. No período de 6 meses, essa redução apresentou significância estatística entre os grupos PLA/CHA e PLA/CHA com esferoides não induzidos semeados (Fig. 60C).

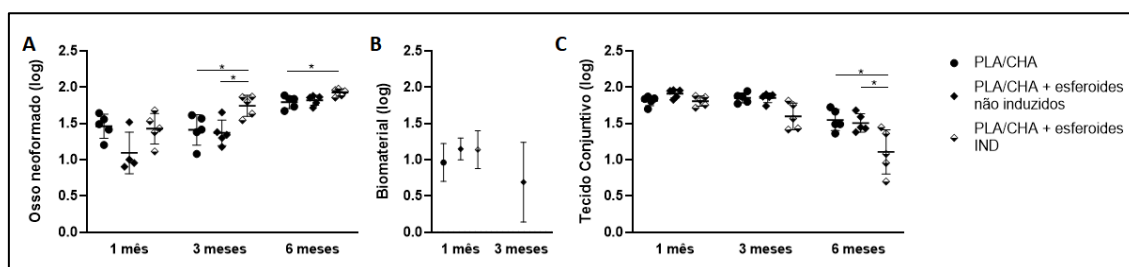


Figura 60: Quantificação de osso neoformado, biomaterial e tecido conjuntivo nos grupos implantados em defeito ósseo crítico de calvária em ratos após 1, 3 e 6 meses. (A) Quantificação de osso neoformado. (B) Quantificação de biomaterial. (C) Quantificação de tecido conjuntivo. Os resultados da quantificação estão representados em escala logarítmica. PLA/CHA: (poli (ácido lático)/carbonato apatita; IND: induzido. Os asteriscos indicam valores de p obtidos por teste one-way ANOVA, o qual foi empregado a fim de analisar a diferença estatística entre os grupos (* $p<0,05$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0005$; **** $p<0,0001$).

6. MATERIAL E MÉTODOS: PARTE B

6.1 EXPANSÃO EM CULTIVO DE MONOCAMADA DAS *BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS* (bmMSCs, *DO INGLÊS*, CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA)

As células-tronco derivadas da medula óssea humana (bmMSCs) foram isoladas da medula óssea humana não processada (Lonza) com base na aderência ao plástico da garrafa de cultura. Todas as bmMSCs utilizadas neste estudo foram semeadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/cm² em meio DMEM modificado com alta glicose (DMEM *HIGH* GlutaMAX) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina (todos os reagentes da Gibco, Biosciences, Dublin, Irlanda) e 5 ng/mL FGF-2 (Prospect Bio). As células foram mantidas em cultivo sob condições de hipóxia (37° C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 5% de O₂) para melhorar a capacidade condrogênica. Após alcançar a confluência de 90%, as bmMSCs foram tripsinizadas utilizando tripsina solubilizada em 0,25% de EDTA e re-plaqueadas para nova expansão em monocamada de células.

6.2 EXPANSÃO EM CULTIVO DE MONOCAMADA DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS

Células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs, *do inglês, human umbilical vein endothelial cells*, Lonza, Walkersville, MD) foram cultivadas em uma densidade de 2.500 células/cm² em meio de crescimento endotelial (EGM-2) que foi suplementado com EGM-2 *BulletKit*® (Lonza). As células foram mantidas em cultivo sob condições de hipóxia (37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 5% de O₂). Após alcançar a confluência de 95%, as bmMSCs foram tripsinizadas utilizando tripsina solubilizada em 0,25% de EDTA e re-plaqueadas para nova expansão em monocamada de células para uso em até passagem 4.

6.3 PREPARO DA BIOTINTA DE FIBRINA

A fim de permitir o uso da fibrina como uma biotinta para os ensaios de *sprouting*, para o processo de semeadura dos esferoides no canal central do arcabouço de PCL e para a bioimpressão de esferoides vasculares, um método utilizando a gelatina como um carreador foi adaptado (Kiang *et al.*, 2016).

Inicialmente, ácido hialurônico (Sigma) foi adicionado ao meio DMEM modificado com alta glicose (DMEM *HIGH* GlutaMAX; Gibco, Biosciences) a uma concentração de 3 mg/mL e agitado durante a noite a uma temperatura de 37° C. Após esse período, Glicerol a 10% (v/v) (Sigma) foi adicionado na solução, e esta foi mantida em agitação. Em seguida, Gelatina do tipo A (175g bloom; Sigma) foi adicionada a uma concentração de 40 mg/mL e agitada a 37° C até a solução estar totalmente dissolvida a olho nu.

Antes da semeadura dos esferoides, o Fibrinogênio (Sigma) foi adicionado a este gel transportador, previamente descongelado, a uma concentração de 30 mg/mL e agitado a 37°C até sua homogeneização. Após a combinação dos esferoides com esta solução (fibrinogênio e gel transportador), a trombina foi adicionada a uma concentração de 20 U/mL (Sigma) e os esferoides foram mantidos por 30 minutos a 37°C para permitir a polimerização catalisada por trombina de fibrinogênio em fibrina.

6.4 FABRICAÇÃO DOS ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E VASCULARES

Todas as etapas para fabricação dos esferoides descritas a seguir foram realizadas como descrito anteriormente por (BURDIS e KELLY, 2019; NULTY *et al.*, 2021).

6.4.1 Fabricação dos micropoços de agarose

Inicialmente, os micropoços de agarose foram formados em poços individuais de uma placa de 6 poços. Inicialmente, a agarose (Sigma Aldrich) foi dissolvida em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Sigma Aldrich) a uma concentração de 4% (p/v) e autoclavada. Em seguida, a solução de agarose homogeneizada foi dispensada em poços da placa de 6 poços. Os moldes

positivos estéreis impressos em 3D foram então inseridos na agarose (Fig. 28). Um suporte foi então colocado sobre o molde e em seguida, um parafuso foi apertado para garantir a altura e a posição corretas do molde sobre a agarose. Este processo foi repetido para cada poço. Uma vez resfriado, o molde positivo foi retirado da agarose, deixando a agarose padronizada com os micro-poços dentro do poço. No total, é possível produzir 401 micropoços de agarose por poço da placa de 6 poços. Todos os micro-poços de agarose foram mantidos embebidos em meio DMEM antes da semeadura das células.

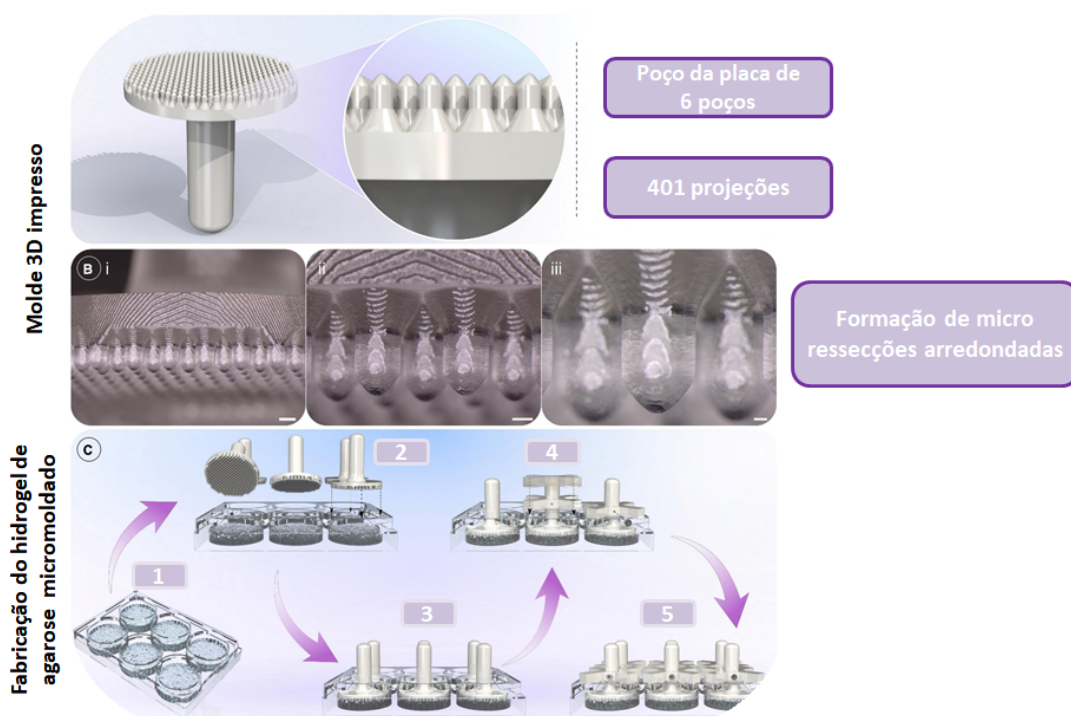


Figura 61: Etapas da fabricação dos micropoços de agarose. (A) Esquema mostrando o molde de resina fabricado a partir de manufatura aditiva. O molde contém 401 projeções e é compatível com a área de um poço de uma placa de 6 poços. (B) Formação das microressecções de agarose com um formato de fundo arredondado. (C) Etapas para a fabricação do hidrogel de agarose micromoldado. 1 – Adição de agarose no interior de um poço de uma placa de 6 poços; 2, 3 - Posicionamento do molde de resina na agarose presente previamente adicionada em um poço de uma placa de 6 poços; 4, 5 – Em seguida, o molde de resina é preso para ficar em uma altura ideal com a agarose (adaptado de NULTY, BURDIS e KELLY, 2021).

6.4.2 Semeadura de células nos micropoços

6.4.2.1 Fabricação dos esferoides hipertróficos

As bmMSCs foram semeadas nos micropoços a partir de uma concentração apropriada (2×10^3 células ou 4×10^3 células/micropoços) em cada poço da placa de 6 poços. Após a semeadura, as placas foram centrifugadas a 700x g por 5 minutos para coletar as células no fundo de cada poço. As placas foram então incubadas em meio de DMEM *HIGH* (hgDMEM GlutaMAX) suplementado com 10% v/v FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (todos Gibco, Biosciences, Dublin, Irlanda) e 5 ng/mL bFGF₂ (Prospect Bio) por um período de 24 h para permitir que a compactação das células ocorresse antes de mudar para meio indutor condrogênico.

Após 24 h, foi iniciada a indução condrogênica dos esferoides com o meio composto de DMEM *HIGH* GlutaMAX suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (ambos Gibco), 100 µg/mL de piruvato de sódio, 40 µg/mL L -prolina, 50 µg/mL de ácido L-ascórbico-2-fosfato, 4,7 µg / mL de ácido linoléico, 1,5 mg/mL de albumina sérica bovina, 1 X insulina-transferrina-selênio, 100 nM de dexametasona (todos da Sigma), 2,5 µg/mL anfotericina B e 10 ng/mL de TGF-β₃ (Prospec-Tany TechnoGene Ltd., Israel). Os esferoides foram mantidos a 37° C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 5% de O₂ por um período de 2 ou 3 semanas.

Após o período de indução condrogênica, os esferoides foram então movidos para uma condição de normóxia com pressão de O₂ de 20% e foi realizada a troca para meio indutor hipertrófico consistindo de DMEM *HIGH* GlutaMAX suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (ambos Gibco), 1x insulina-transferrina-selênio, 4,7 µg/mL de ácido linoléico, 50nM de tiroxina, 100 nM de dexametasona, 250 µM de ácido ascórbico, 7 mM de β-glicerofosfato e 2,5 µg/mL de anfotericina B (todos da Sigma) por mais 1 semana. Todas as análises foram realizadas em uma duplicata experimental.

6.4.2.2 Fabricação dos esferoides vasculares

Para produção dos esferoides vasculares a partir de co-cultura entre bmMSCs e HUVECs, a suspensão de diferentes proporções de bmMSCs e HUVECs foi semeada nos micropoços de agarose utilizando uma concentração total de 2×10^3 células (bmMSCs e HUVECs) em cada poço.

As proporções testadas foram as descritas a seguir: a) 1MSC:1HUVEC, b) 1MSC:3HUVEC, c) 3MSC:1HUVEC e d) HUVEC. Após a semeadura da suspensão contendo os dois tipos celulares, as placas foram centrifugadas a 700x g por 5 minutos para coletar as células no fundo de cada poço. As placas foram então incubadas em meio de crescimento endotelial (EGM-2) que foi suplementado com EGM-2 *BulletKit*® (Lonza) em condições de normóxia para permitir a compactação das células e posterior formação dos esferoides.

Após o período de 24 h, os esferoides vasculares formados de cada proporção foram combinados em biotinta de fibrina, produzida de acordo como foi descrito anteriormente e os construídos foram mantidos em condições de hipóxia por 7 dias. As análises foram feitas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.5 ENSAIO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES INDUZIDOS PARA A VIA CONDROGÊNICA

A fim de investigar a capacidade de fusão dos esferoides produzidos a partir da concentração de células de 2×10^3 induzidos para a via condrogênica, estes foram semeados manualmente em um poço de uma placa de 96 poços em duas condições diferentes de cultivo. A primeira condição foi um ensaio de fusão com duração de 48 h utilizando os esferoides induzidos para a via condrogênica que já estavam em cultivo individualizado nos micropoços de agarose por 1 semana. A segunda condição consistiu em um ensaio de fusão com duração de 48 h utilizando os esferoides induzidos para a via condrogênica que já estavam em cultivo individualizado nos micropoços de agarose por 4 dias. As duas condições foram mantidas em meio de indução condrogênico em hipóxia. Após o período de fusionamento, foram realizadas análises por microscopia de

contraste de fase e de fluorescência para avaliar o processo de fusão dos esferoides.

6.6 SEMEADURA DOS ESFEROIDES VASCULARES NA PROPORÇÃO DE 3MSC:1HUVEC EM DIFERENTES DENSIDADES NA BIOTINTA DE FIBRINA

Uma vez determinada a melhor proporção de células para produção dos esferoides vasculares, no caso a 3MSC:1HUVEC, foi necessário investigar em qual tipo de densidade (baixa, média ou alta) na biotinta de fibrina estes esferoides apresentariam a melhor resposta funcional de *sprouting*.

Para isso, os esferoides vasculares na proporção de 3MSC:1HUVEC foram produzidos, coletados, e semeados manualmente, após contagem prévia, em uma densidade baixa (até 20 esferoides), média (entre 40 e 60 esferoides) e alta (entre 80 e 120 esferoides) na biotinta de fibrina preparada como descrito anteriormente. Os construídos foram mantidos em meio de crescimento endotelial (EGM-2) que foi suplementado com EGM-2 *BulletKit*® (Lonza) por um período de 7 dias em condições de hipóxia.

É importante destacar que neste experimento, foi investigada a expansão e manutenção das bmMSCs também em cultivo de normóxia antes da formação dos esferoides vasculares. As análises foram feitas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.7 BIOIMPRESSÃO DOS ESFEROIDES VASCULARES EM BIOTINTA DE FIBRINA

Os esferoides vasculares em uma alta densidade na biotinta de fibrina foram impressos utilizando o sistema de bioimpressão de multi-cabeçotes 3D *Discovery* (RegenHu, Suíça). O sistema de bioimpressão 3D *Discovery* foi mantido em cabine de segurança biológica para garantir a esterilidade em todo o processo de biofabricação. Para o processo de bioimpressão, foi utilizada uma seringa pneumática com agulha 25G em temperaturas entre (10 – 25) °C sob pressões entre 0,05 MPa - 0,2 MPa.

Após o processo de bioimpressão, todos os construídos foram ainda imersos em um banho de trombina (20 U/mL) por 30 minutos a 37°C para permitir

a polimerização catalisada por trombina de fibrinogênio em fibrina. Em seguida, foi adicionado meio de crescimento endotelial (EGM-2) que foi suplementado com EGM-2 *BulletKit*® (Lonza) e os construídos foram mantidos por 24 h em cultivo sob condições de hipóxia. É importante destacar que uma condição não induzida dos esferoides vasculares que não passaram pelo processo de bioimpressão foi também mantida em cultivo sob as mesmas condições experimentais. Após o período de 24 h, foram feitas análises de medição de diâmetro, esfericidade, viabilidade celular e coloração histológica para acessar a morfologia. As análises foram feitas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.8 PREPARO DOS ARCABOUÇOS DE PCL POR MANUFATURA ADITIVA

Os arcabouços de policaprolactona (PCL) foram projetados utilizando o *software* BioCAD™ e produzidos utilizando o sistema de bioimpressão de multi-cabeçotes 3D *Discovery* (RegenHu, Suíça). Os arcabouços de PCL (CAPA Ingevity, SC, EUA) foram impressos a 80°C a 0,5 MPa utilizando uma agulha 27G a partir da técnica de extrusão por *fused deposition modelling* (FDM, *do inglês*, modelagem de deposição fundida). Duas arquiteturas diferentes foram projetadas e fabricadas a fim de utilizar para defeitos do tipo subcutâneo em camundongos e femoral em ratos. Ambos os modelos foram cilíndricos. Para o defeito subcutâneo, os arcabouços apresentaram altura de 2 mm e diâmetro de 2 mm e para o defeito femoral, os arcabouços apresentaram altura de 5 mm e diâmetro de 5 mm. Ambos os arcabouços eram porosos e foram impressos com arcos de sustentação em cada camada.

6.9 PROCESSO DE REVESTIMENTO DE NANO HIDROXIAPATITA (nHA) NOS ARCABOUÇOS DE PCL

Os arcabouços de PCL foram revestidos de acordo com um protocolo publicado anteriormente (EICHHOLZ e HOEY, 2019). Para revestir os arcabouços de PCL com agulhas de nano hidroxiapatita (nHA) de aproximadamente 100 nm de comprimento e 37 nm de diâmetro, os arcabouços foram lavados em etanol 70% (v/v) por 15 min sob vácuo (VWR). Os arcabouços

foram então imersos em NaOH 2 M a 37°C durante 45 minutos. Em seguida, os arcabouços foram lavados em água milliQ antes de serem imersos em solução de cálcio 0,05 M (Sigma). Adicionou-se uma solução de fosfato 0,03 M em partes iguais e os suportes foram incubados durante 30 minutos a 37° C. Este processo foi repetido um total de doze vezes resultando, portanto em um total de 12 revestimentos. Ao final do processo, os arcabouços foram imersos em NaOH 0,5 M e incubados nesta solução por 30 minutos antes de serem lavados em água milliQ e deixados para secar a temperatura ambiente. Após a secagem, os arcabouços foram esterilizados usando óxido de etileno (ETO) gasoso.

6.10 SEMEADURA DOS ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E VASCULARES EM ARCABOUÇO DE PCL 3D IMPRESSO

A fim de produzir construídos contendo tanto esferoides induzidos para a via hipertrófica fusionados, como esferoides vasculares produzidos a partir do co-cultivo entre HUVECs e MSCs, foi realizada a semeadura desses esferoides em arcabouço 3D impresso revestido previamente com nHA.

Inicialmente, foram produzidos os esferoides hipertróficos contendo 4.000 células/esferoide. Esses esferoides foram semeados após dois dias no arcabouço de PCL, com exceção do canal central e mantidos em meio indutor condrogênico sob condições estatísticas de hipóxia. Após 24 h da semeadura, os construídos foram transferidos para um sistema dinâmico de bioreator por 2 semanas em meio indutor condrogênico e por 1 semana em meio indutor hipertrófico, totalizando um período de 3 semanas em cultivo dinâmico.

Após 3 semanas, foi realizada a fabricação dos esferoides vasculares provenientes do co-cultivo, como descrito anteriormente na proporção de 3MSC:1HUVEC. Após 24 h da semeadura das células para formação dos esferoides, estes foram semeados em uma alta densidade em biotinta de fibrina, como descrito anteriormente e semeados no canal central do arcabouço de PCL. Após a semeadura, os construídos foram mantidos por um período de 7 dias em condição estática.

É importante destacar que além desse grupo, foi mantido em cultivo um grupo de construídos contendo o canal vascular não preenchido, ou seja, somente com os esferoides induzidos para hipertrofia fusionados ao redor do

canal central sob as mesmas condições citadas anteriormente. As análises foram realizadas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.11 MEDIÇÃO DOS DIÂMETROS MAIOR E MENOR DOS ESFEROIDES

Para medição do diâmetro maior e menor dos esferoides, foram capturadas imagens digitais dos esferoides ao longo das semanas de cultivo, com o auxílio do microscópio óptico invertido equipado com câmera digital (Leica DFC 500). Os diâmetros maior e menor dos esferoides foram determinados com auxílio do *software* ImageJ. Em seguida, foi calculada a média aritmética dos diâmetros dos esferoides e a fim de avaliar a homogeneidade de tamanho, foi realizado o cálculo da razão entre os diâmetros menor e maior dos esferoides. É importante ressaltar que quanto mais próximo a 1 o valor da razão dos diâmetros, mais próximo ao formato de uma esfera estão os esferoides. As análises dos esferoides foram realizadas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.12 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR POR KIT COMERCIAL DE FLUORESCÊNCIA *LIVE/DEAD*®

A viabilidade celular dos esferoides vasculares controles e após processo de bioimpressão foi estabelecida utilizando um ensaio por kit comercial de fluorescência *LIVE/DEAD*® de acordo com as recomendações do fabricante. Após a incubação, os esferoides vasculares foram lavados novamente em PBS e fotografados com Microscópio Confocal de Varredura de Ponto Olympus FV-1000 (canais 488 nm e 543 nm). As análises dos esferoides foram realizadas utilizando o mesmo doador em uma duplicata experimental.

6.13 ANÁLISES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para as análises de imunofluorescência, os esferoides induzidos para a via condrogênica fusionados, os esferoides vasculares em biotinta de fibrina e o construído de PCL com o canal vascular não preenchido passaram pelo mesmo protocolo de processamento descrito a seguir.

Inicialmente, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 1 hora. Após a fixação, as amostras foram lavadas novamente duas vezes em PBS e incubadas em solução de Triton X 0,1% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a incubação com o marcador de citoesqueleto Faloidina 660 nm na concentração de 1:40 por 1 hora a temperatura ambiente seguida por lavagem duas vezes em PBS para incubação com o marcador nuclear DAPI 1:500 por 10 minutos a temperatura ambiente. Para a incubação dos marcadores, as amostras foram protegidas da exposição à luz. Por fim, foi realizada a lavagem duas vezes em PBS e as amostras foram fotografadas com Microscópio Confocal de Varredura de Ponto Olympus FV-1000.

É importante destacar que as HUVECs são transfectadas com *green fluorescence protein* (GFP, do inglês, proteína verde fluorescente) citoplasmático e, portanto, não é necessária nenhuma marcação prévia para visualização no microscópio confocal de sua morfologia e de eventos de *sprouting* e formação de micro vasos.

6.14 ANÁLISE BIOQUÍMICA QUANTITATIVA

As amostras de esferoides induzidos para a via condrogênica, hipertrófica e os construídos desenvolvidos a partir da semeadura de esferoides hipertróficos e vasculares no arcabouço de PCL foram recuperadas da cultura, lavadas em PBS e congeladas para avaliação bioquímica quantitativa subsequente.

As amostras foram então digeridas em 3,88 U/mL de papaína preparada em tampão de fosfato de sódio 100 mM/Na₂EDTA 5 mM/L-cisteína 10 mM, pH 6,5 (todos os reagentes da Sigma) a 60°C sob rotação constante por 18 h. O conteúdo de DNA foi quantificado utilizando o ensaio de corante *Hoechst* Bisbenzimidaz 33258, com um DNA de timo de bezerro considerado como leitura padrão, a partir de um leitor de microplacas de detecção múltipla *Synergy* HT (BioTek Instruments, Inc) em excitação de 360 nm e emissão de 460 nm.

A quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG) foi quantificada utilizando o ensaio de ligação de corante azul de dimetilmetileno (Blyscan, Biocolor Ltd., Irlanda do Norte), com um padrão de sulfato de condroitina lido a partir do leitor de microplaca de detecção múltipla *Synergy* HT (BioTek

Instruments, Inc) com um comprimento de onda definido para 656 nm. Os valores obtidos de sGAG foram normalizados para DNA, a fim de determinar a influência do processo de diferenciação condrogênica em um nível celular.

6.15 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Todas as amostras de esferoides e construídos foram processadas histologicamente a partir da mesma metodologia descrita a seguir.

As amostras foram inicialmente fixadas em paraformaldeído 4% e em seguida desidratadas em séries graduadas de soluções de etanol (70-100%), clarificadas em xileno e incluídas em parafina (todos os reagentes da Sigma-Aldrich). É importante destacar que as amostras do ensaio *in vivo* foram descalcificadas após fixação em paraformaldeído 4% utilizando a “Solução de descalcificação-Lite” (Sigma) por aproximadamente 1 semana. As amostras foram frequentemente radiografadas para determinar se algum conteúdo mineral permaneceu. Quando nenhum mineral era visível, a amostra foi considerada descalcificada para dar continuidade no protocolo a partir da desidratação como descrito anteriormente.

Em seguida, as seções (5 µm) obtidas em micrótomo foram reidratadas em séries graduadas e coradas com coloração de Hematoxilina e Eosina, 1% (p/v) do corante de Alcian *Blue* 8GX em 0,1 M HCL para avaliar o conteúdo de glicosaminoglicanos sulfatados (sGAG), com uma contra coloração de 0,1% (p/v) de vermelho rápido nuclear para avaliar a distribuição celular, Picrosirius *Red* 0,1% (p/v) para avaliar a distribuição de colágeno e Alizarina vermelha para visualização de depósitos de cálcio (todos os reagentes da Sigma). As lâminas foram então fotografadas usando o *scanner* de slides Aperio ScanScope.

6.16 IMPLANTE SUBCUTÂNEO EM CAMUNDONGOS

Os construídos de acordo com os respectivos grupos: 1) esferoides hipertróficos fusionados no arcabouço de PCL com o canal central preenchido por esferoides vasculares, 2) esferoides hipertróficos fusionados no arcabouço de PCL com o canal central não preenchido e 3) arcabouço de PCL vazio foram

implantados subcutaneamente nas costas de ratos nus fêmeas Balb/c (Harlan, Reino Unido).

Para o processo cirúrgico, duas incisões subcutâneas foram feitas ao longo da linha central da coluna dos animais, uma nos ombros e a outra nos quadris. Em seguida, dois construídos foram implantados em cada região. No total, oito construídos foram implantados por grupo e foram coletados 8 semanas pós-implantação. Os camundongos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina e o carprofeno foi adicionado à água dos animais por 24 horas após a cirurgia. Para o processo de eutanásia, os camundongos foram sacrificados por inalação de CO₂. Este protocolo e desenho do estudo pré-clínico foram revisados e aprovados pelo comitê de ética da universidade *Trinity College of Dublin*. As amostras após o processo de eutanásia foram mantidas fixadas em paraformaldeído 4% até as análises histológicas.

6.17 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações de diâmetro dos esferoides induzidos para a via condrogênica e hipertrófica ao longo do tempo, esferoides produzidos a partir de diferentes proporções de co-cultivo e esferoides bioimpressos foram realizadas a partir do *one-way* ANOVA, seguido por comparações múltiplas entre os grupos. Os resultados nos gráficos foram expressos como média $\pm$ erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o *software* GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Inc., CA, EUA).

7. RESULTADOS: PARTE B

7.1 OS ESFEROIDES DE bmMSC CONTENDO 2.000 CÉLULAS/CADA APRESENTAM REDUÇÃO EM SEU VALOR DE DIÂMETRO E ESFERICIDADE AO LONGO DO PERÍODO DE CULTIVO

Para analisar o tamanho e a homogeneidade do tamanho dos esferoides de bmMSC induzidos ao longo do tempo (até 28 dias de cultivo), foi realizada a medição dos diâmetros maior e menor dos esferoides e o cálculo da esfericidade entre estes diâmetros (Fig. 62).

Houve uma tendência de diminuição do diâmetro dos esferoides induzidos a partir de 10 dias de cultivo (com uma recuperação a partir de 21 dias) (Fig. 62B). Houve diferença significativa da esfericidade dos esferoides induzidos ao longo do tempo de cultivo, entre 24 h e 10 dias, com redução no valor de esfericidade para 0,93 e entre 24 h e 28 dias, onde foi possível observar uma nova redução de esfericidade para o valor de 0,9 (Fig. 62C).

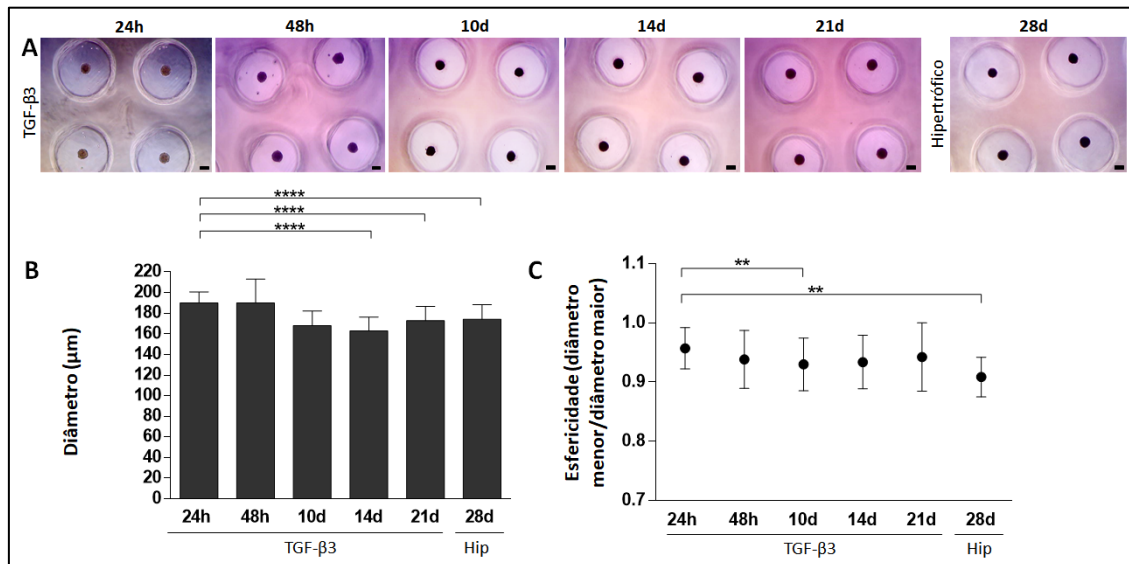


Figura 62: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de bmMSC induzidos ao longo de 28 dias de cultivo. (A) Micrografias de contraste de fase representativas dos esferoides induzidos no período de 24h até 28 dias de cultivo. (B) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides induzidos ao longo do período de cultivo. (C) Valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides induzidos. Os asteriscos indicam valores de p obtidos por *one-way* ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$). Barra de aumento: 100 μm .

7.1.1 Caracterização histológica dos esferoides de bmMSC contendo 2.000 células/cada

Após 21 dias de cultivo, a partir da coloração por Hematoxilina e Eosina, foi observado que as células no interior dos esferoides apresentaram majoritariamente uma morfologia arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 63A, seta), quando comparado com as células localizadas na periferia, que apresentaram uma morfologia fibroblastóide, verificada pela presença de núcleos mais fusiformes (Fig. 63A, asterisco). Em relação ao conteúdo extracelular, não foi observada uma alta quantidade de fibras (Fig. 63A).

A partir da coloração por Alcian *Blue*, foi observada uma baixa intensidade de marcação para sGAG em toda a área dos esferoides (Fig. 63B). A coloração por Picrossirius *Red* revelou uma alta intensidade de marcação para fibras colágenas de forma homogênea em todo o esferoide (Fig. 63C, seta). Por fim, foi possível observar que os esferoides induzidos não apresentaram depósitos de cálcio, devido à marcação negativa para Alizarina vermelha (Fig. 63D).

Em consonância com as análises histológicas, os esferoides induzidos foram submetidos a uma análise bioquímica para quantificação total de sGAG/DNA (Fig. 63E). O resultado mostrou uma quantidade total de sGAG/DNA no valor de 7µg ao final dos 21 dias de cultivo (Fig. 63E).

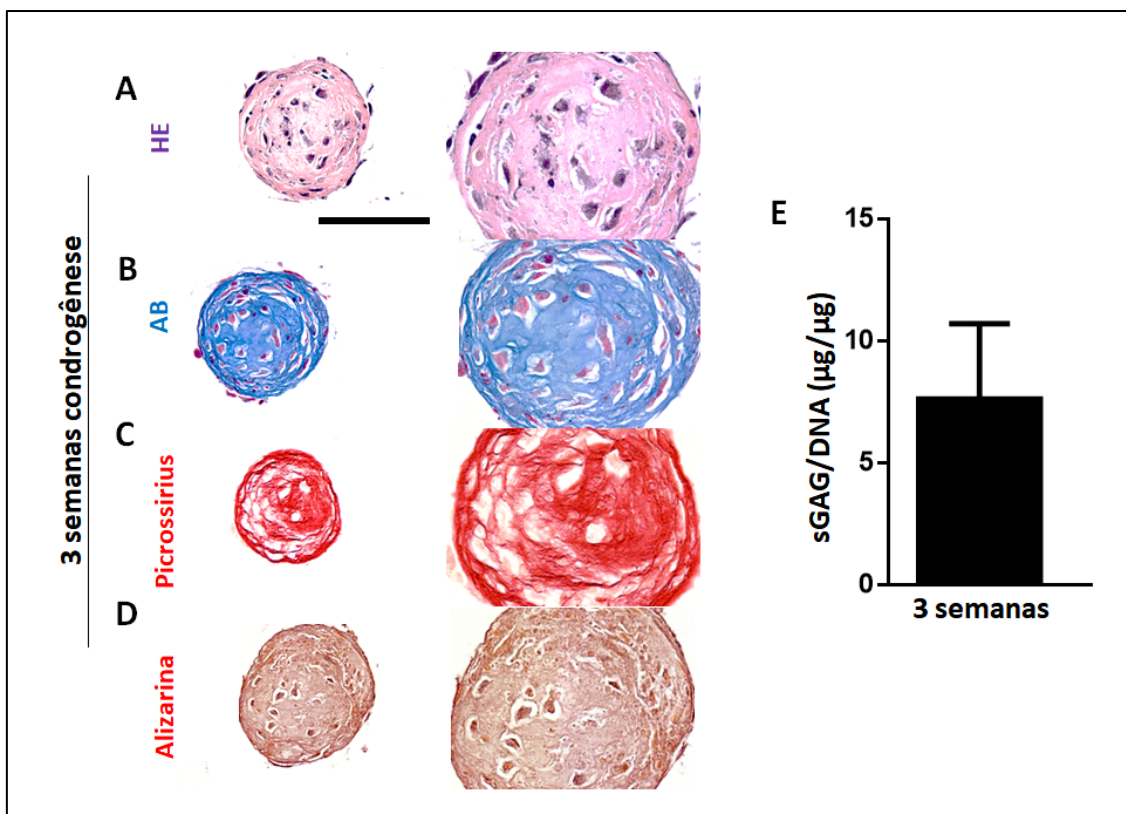


Figura 63: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha e quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides de bmMSC induzidos após 21 dias de cultivo. (A) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Note a presença de células no interior do esferoide com a morfologia arredondada (seta), ao passo que as células periferia apresentaram uma morfologia fibroblastóide (asterisco). (B) Coloração por Alcian Blue. (C) Coloração por Picrossirius Red. Note uma maior intensidade de marcação em uma região no centro dos esferoides induzidos (seta). (D) Coloração por Alizarina vermelha. (E) Quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides induzidos. HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian Blue. Barra de aumento: 100 μm .

Após 28 dias de cultivo, a partir da coloração por Hematoxilina e Eosina, foi observada em toda a extensão dos esferoides induzidos, tanto na região central como na periferia, células com morfologia arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 64A, seta). Além disso, foi possível observar uma nova organização da matriz extracelular, com uma maior quantidade de fibras, principalmente em áreas próximas a periferia dos esferoides (Fig. 64A, asterisco).

A partir da coloração por Alcian Blue, foi observada uma maior intensidade de marcação para sGAG na região periférica dos esferoides induzidos (Fig. 64B, seta), quando comparado com a região central. A coloração por Picrossirius Red revelou uma alta intensidade de marcação para fibras colágenas em toda a área dos esferoides induzidos (Fig. 64C). Por fim, os esferoides induzidos

apresentaram uma marcação negativa para a coloração de Alizarina vermelha (Fig. 64D, seta).

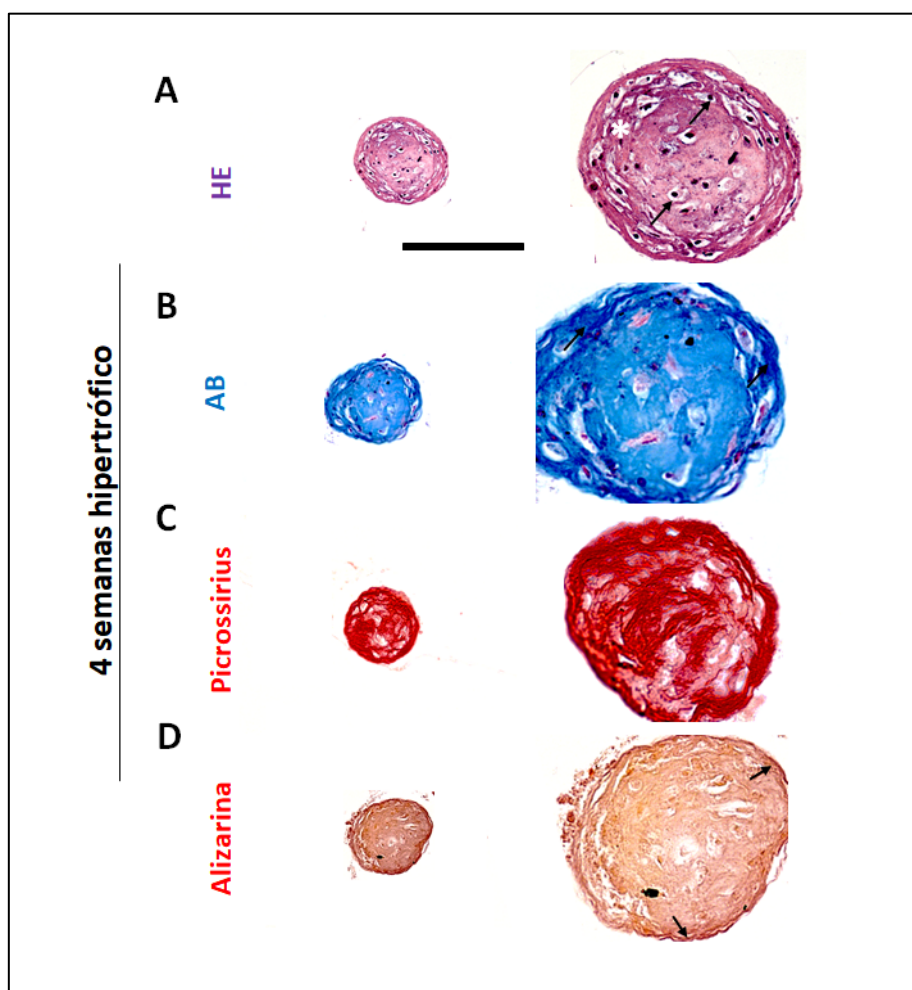


Figura 64: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian *Blue*, Picrossirius *Red* e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 28 dias de cultivo. (A) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Note a presença de células em toda a região dos esferoides com a morfologia arredondada (seta). (B) Coloração por Alcian *Blue*. Note uma maior intensidade de marcação na região periférica dos esferoides induzidos (seta). (C) Coloração por Picrossirius *Red*. (D) Coloração por Alizarina vermelha. Note uma maior intensidade de marcação na região periférica dos esferoides induzidos (seta). HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian *Blue*. Barra de aumento: 100 μ m.

7.2 OS ESFEROIDES DE bmMSC CONTENDO 4.000 CÉLULAS/CADA APRESENTAM AUMENTO EM SEU VALOR DE DIÂMETRO E MANUTENÇÃO DA ESFERICIDADE AO LONGO DO PERÍODO DE CULTIVO

Foi observada uma diferença de média de diâmetro nos esferoides induzidos a partir de 4 dias de indução até o final do experimento (Fig. 65E). Após 6 dias, os esferoides induzidos apresentaram um crescimento significativo

na média de diâmetro de 400 μ m, ao passo que no início do período de cultivo, até 48h, os esferoides induzidos tiveram uma média de diâmetro de 300 μ m. Já em 2 semanas, os esferoides induzidos apresentaram um novo aumento em seu diâmetro para uma média de 450 μ m. As diferenças entre o diâmetro de esferoides induzidos no período de 4 dias e 6 dias, quando comparado com o final do cultivo em 2 semanas foi significativa (Fig. 65E).

Sendo assim, houve uma tendência de aumento do diâmetro médio dos esferoides induzidos a partir de 4 dias até 2 semanas de cultivo (Fig. 65E). Não houve diferença significativa da esfericidade dos esferoides induzidos ao longo do tempo de cultivo e foi possível observar que em todos os períodos analisados, os esferoides induzidos apresentaram um valor superior a 0.95 de esfericidade, o que sugere que estes esferoides apresentam homogeneidade de tamanho e forma (Fig. 65F).

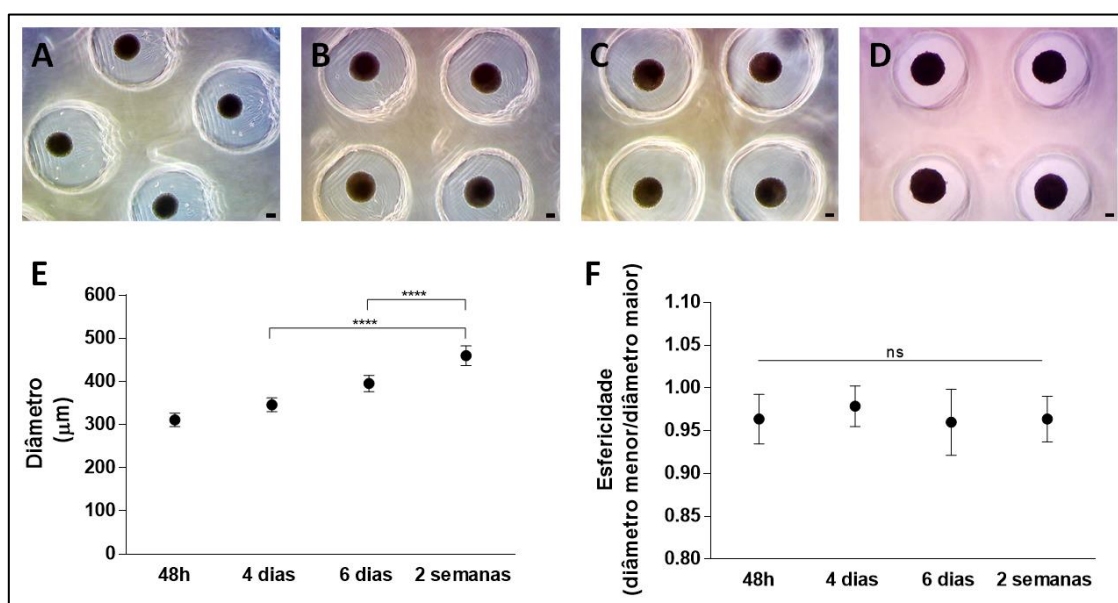


Figura 65: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de bmMSC induzidos contendo 4.000 células/cada ao longo de 2 semanas de cultivo. (A-D) Micrografias de contraste de fase representativas dos esferoides induzidos no período de 48h (A), 4 dias (B), 6 dias (C) e 2 semanas (D). (E) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides induzidos ao longo do período de cultivo. (F) Valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides induzidos. Os asteriscos indicam valores de p obtidos por one-way ANOVA não paramétrico e não pareado seguido de múltiplas comparações (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$). Abreviação: ns – *no statistical difference* (do inglês, sem diferença estatística). Barra de aumento: 100 μ m.

7.2.1 Caracterização histológica dos esferoides de bmMSC contendo 4.000 células/cada

Após 2 dias de cultivo, a partir da coloração por Hematoxilina e Eosina, foi observado que as células no interior do esferoide apresentaram uma morfologia celular arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 66A, seta), quando comparado com as células localizadas na periferia, que apresentaram uma morfologia fibroblastóide, verificada pela presença de núcleos mais fusiformes (Fig. 66A, asterisco). Em relação ao conteúdo extracelular, não foi observada uma alta quantidade de fibras (Fig. 66A).

A partir da coloração por Alcian *Blue*, foi observada uma baixa distribuição de marcação para sGAG em toda a área dos esferoides (Fig. 66B). A coloração por Picrossirius *Red* revelou uma alta intensidade de marcação para fibras colágenas, em toda a área dos esferoides (Fig. 66C). Por fim, foi possível observar que os esferoides induzidos não apresentaram depósitos de cálcio, devido à marcação negativa para Alizarina vermelha (Fig. 66D).

Além das análises histológicas para analisar o início do processo de diferenciação condrogênica, os esferoides induzidos foram submetidos a uma análise bioquímica para quantificação total de sGAG/DNA (Fig. 66E). O resultado mostrou uma quantidade total de sGAG/DNA no valor de 6 µg (Fig. 66E).

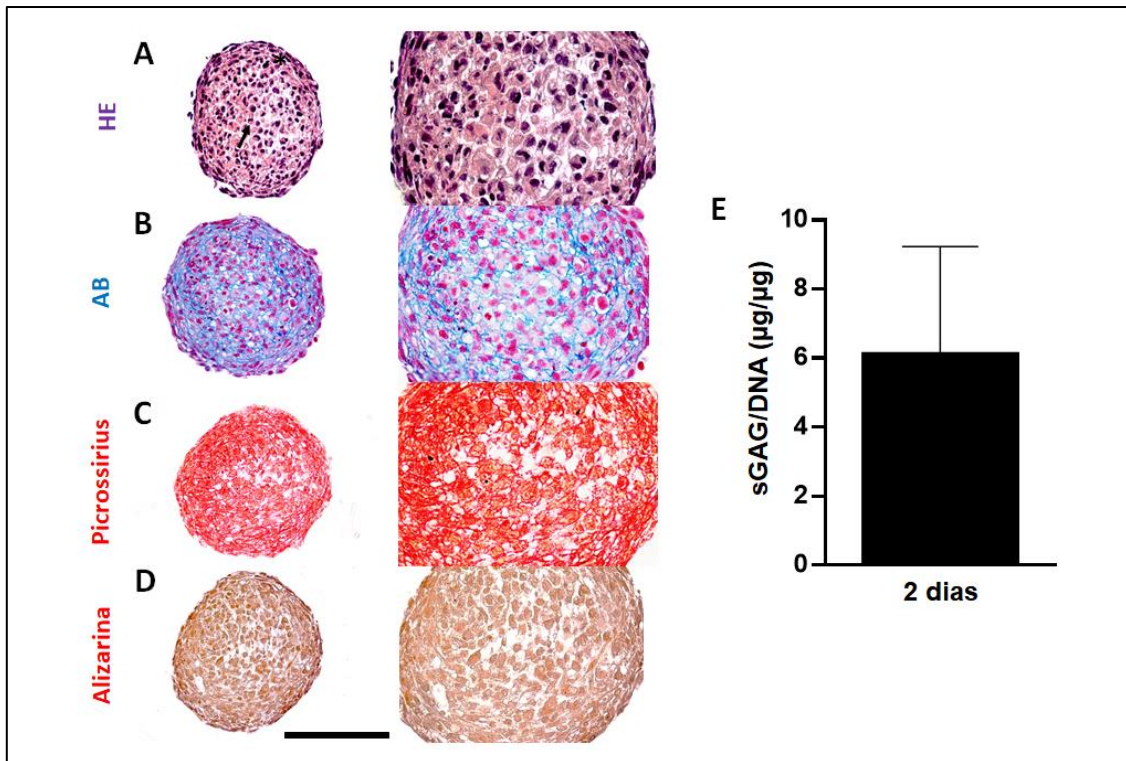


Figura 66: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian *Blue*, Picrossirius *Red* e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 2 dias de cultivo. (A) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Note a presença de células em toda a região central dos esferoides com a morfologia arredondada (seta). (B) Coloração por Alcian *Blue*. (C) Coloração por Picrossirius *Red*. (D) Coloração por Alizarina vermelha. (E) Quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides induzidos. HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian *Blue*. Barra de aumento: 200 µm.

Após 2 semanas de cultivo, a partir da coloração por Hematoxilina e Eosina, foi observada quem em toda a extensão dos esferoides induzidos, tanto na região central como na periferia, as células apresentaram uma morfologia arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 67A).

A partir da coloração por Alcian *Blue*, foi observada uma alta intensidade de marcação para sGAG em toda a região dos esferoides induzidos (Fig. 67B). A coloração por Picrossirius *Red* revelou uma alta intensidade de marcação para fibras colágenas principalmente na região periférica dos esferoides induzidos (Fig. 67C, seta). Por fim, foi possível observar que os esferoides induzidos apresentaram uma marcação negativa para coloração de Alizarina vermelha em toda a área dos esferoides (Fig. 67D).

Além das análises histológicas para analisar o desenvolvimento do processo de diferenciação condrogênica, os esferoides induzidos foram submetidos a uma análise bioquímica para quantificação total de sGAG/DNA

(Fig. 67E). O resultado mostrou uma quantidade total de sGAG/DNA, no valor de 14µg, ao final das 2 semanas de cultivo (Fig. 67E).

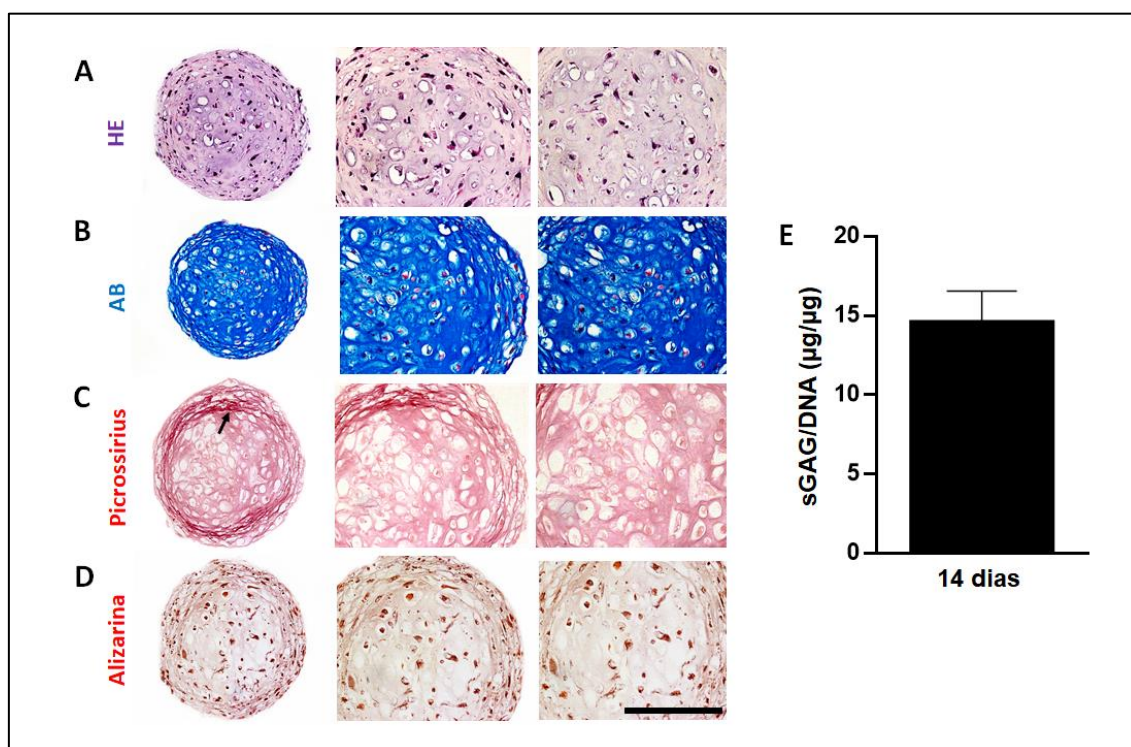


Figura 67: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos esferoides de bmMSC induzidos após 2 semanas de cultivo. (A) Coloração por Hematoxilina e Eosina. (B) Coloração por Alcian Blue. (C) Coloração por Picrossirius Red. Note uma maior intensidade de marcação na região periférica dos esferoides (seta). (D) Coloração por Alizarina vermelha. (E) Quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides induzidos. HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian Blue. Barra de aumento: 300 µm.

7.3 OS ESFEROIDES DE bmMSC APRESENTAM RESISTÊNCIA AO PROCESSO DE FUSÃO EM MEIO DE INDUÇÃO CONDROGÊNICO

A fim de avaliar a capacidade de fusão dos esferoides de bmMSC induzidos previamente por 7 dias em meio de indução condrogênico, foi feito um ensaio de fusão destes esferoides por um período de até 48 h em cultivo (Fig. 68 e Fig. 69).

A partir das micrografias de contraste de fase (Fig. 68), após 24 h do início do processo de fusão, foi possível observar que os esferoides não se fusionaram entre si, apresentando-se individualizados (Fig. 68 A-C). Após 48 h do processo de fusão, foi possível observar uma aproximação entre os esferoides, marcada pela redução de espaços livres nas micrografias (Fig. 68 D-F, setas), quando

comparado com o período de 24 h. No entanto, não foi possível observar uma fusão completa dos esferoides em uma única estrutura microtecdial (Fig. 68 D-F).

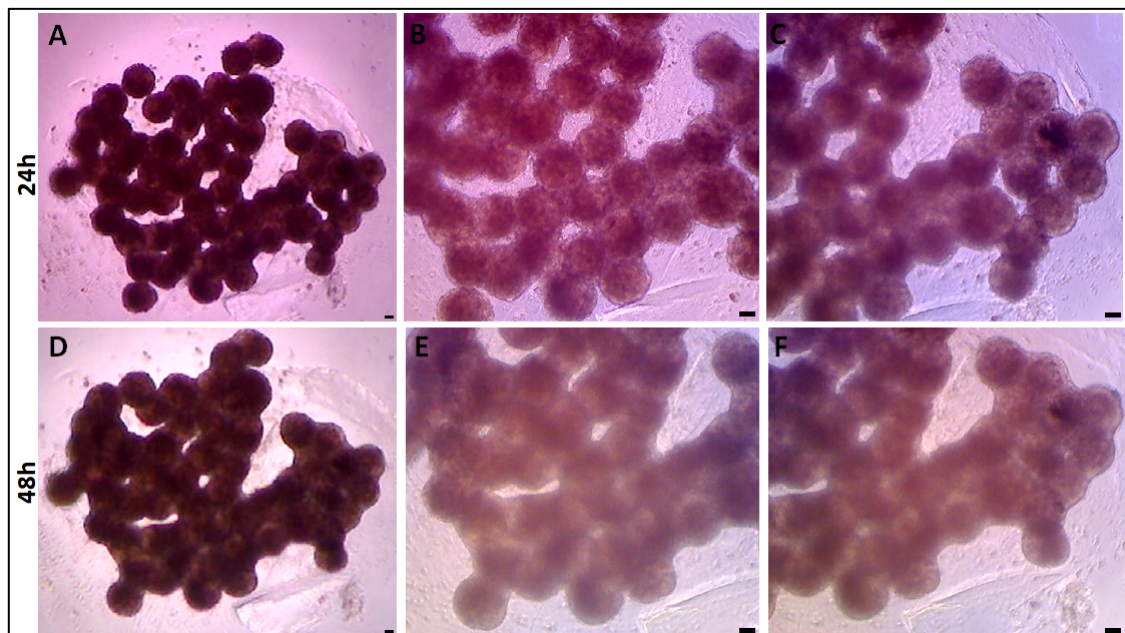


Figura 68: Micrografias de contraste de fase após 24h e 48h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 7 dias em meio de indução condrogênico. (A-C) Micrografias de contraste de fase dos esferoides induzidos por 7 dias em meio de indução condrogênico e submetidos ao processo de fusão por 24h. (D-F) Micrografias de contraste de fase dos esferoides induzidos por 7 dias em meio de indução condrogênico e submetidos ao processo de fusão por 48 h. Barra de aumento: 100 μ m.

A partir de microscopia de fluorescência, foi possível observar com mais detalhes o processo de fusão nos esferoides induzidos. A figura 69 abaixo mostra nitidamente que os esferoides não se fusionaram por completo em uma única estrutura, sendo possível inclusive visualizá-los individualmente como nas imagens de 'E-F'. No entanto, em regiões nas quais estaria ocorrendo um maior contato entre os esferoides, foi possível observar uma maior intensidade do marcador Faloidina (Fig. 69 A-D, setas). Além disso, em áreas de contato entre os esferoides, foi possível observar que as células apresentaram uma morfologia celular fibroblastóide evidenciada pelos núcleos fusiformes (Fig. 69H, seta).

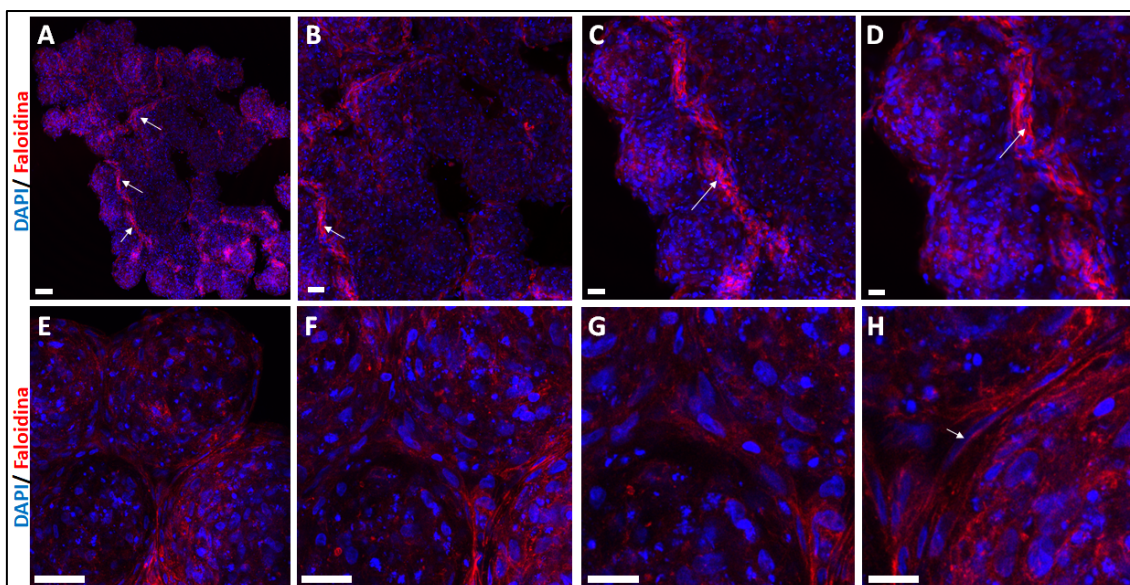


Figura 69: Micrografias de fluorescência após 48 h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 7 dias em meio de indução condrogênico. (A-D) Note que nas áreas de intercessão dos esferoides fusionados, há uma maior intensidade de faloidina (setas). (E-H) Observe que os esferoides não se fusionaram e que as células na região da fusão apresentaram uma morfologia fibroblastóide (H, seta). Barra de aumento: 100 μ m.

7.4 OS ESFEROIDES DE BMMSC SE FUSIONAM APÓS 48H DE CULTIVO PREVIAMENTE REALIZADO EM MEIO DE INDUÇÃO CONDRÓGÊNICO

A fim de avaliar a capacidade de fusão dos esferoides de bmMSC induzidos previamente por 48 horas em meio de indução condrogênico, foi feito um ensaio de fusão destes esferoides por um período de até 48 h em cultivo (Fig. 70).

A partir de microscopia de fluorescência, foi observado que os esferoides se fusionaram por completo em uma única estrutura (Fig. 70), de forma que não foi mais possível identificar esferoides individualizados. Além disso, as células no interior do esferoide fusionado apresentaram-se com um núcleo por vezes de tamanho aumentado, observado pela marcação com DAPI (Fig. 70, setas).

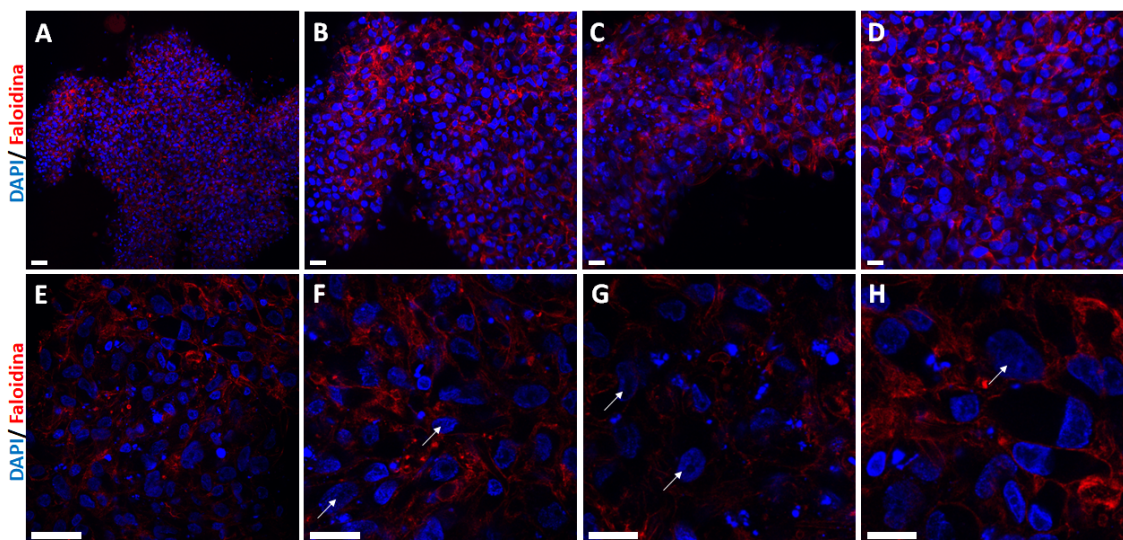


Figura 70: Micrografias de fluorescência após 48 h do processo de fusão dos esferoides de bmMSC cultivados previamente por 2 dias em meio de indução condrogênico. (A-D) Note que os esferoides se fusionaram completamente quando cultivados por apenas 48 h em meio indutor condrogênico. (E-H) Em maior aumento, observe que o núcleo das células apresentou um tamanho aumentado (setas). Barra de aumento: A-D: 200 μm ; E-H: 100 μm .

7.5 ESFEROIDES DE CO-CULTURA ENTRE bmMSCS/HUVECS APRESENTAM DIFERENÇAS DE MORFOLOGIA, DIÂMETRO E ESFERICIDADE E NA PRODUÇÃO DE MICROVASOS DE ACORDO COM PROPORÇÃO DE CÉLULAS INVESTIGADA

A fim de desenvolver um modelo de esferoide estável e funcional de co-cultura entre as *human* bmMSCs e HUVECs, diferentes proporções de células foram inicialmente testadas. A figura 71 mostra um panorama geral do processo de formação do esferoide de co-cultura entre as *human* bmMSCs e HUVECs.

Na imagem C da figura 71, é possível visualizar uma imagem representativa do início do processo de auto-montagem do esferoide de co-cultura e após 24 h (Fig. 71D), os esferoides se formaram, completando o processo de compactação. Após o período de 7 dias em cultura, foi feita análise histológica do cultivo de co-cultura que apresentou melhor resposta funcional na produção de microvasos, como visualizado nas imagens representativas de coloração por Hematoxilina e Eosina (Fig. 71E, F). A partir da coloração por Hematoxilina e Eosina, é possível observar células com 2 morfologias diferentes, de acordo com o formato nuclear. Na região central, é possível observar células com núcleos mais arredondados, enquanto que na periferia do esferoide,

encontram-se majoritariamente células com morfologia fibroblastóide, devido à presença de um núcleo fusiforme (Fig. 71E, F).

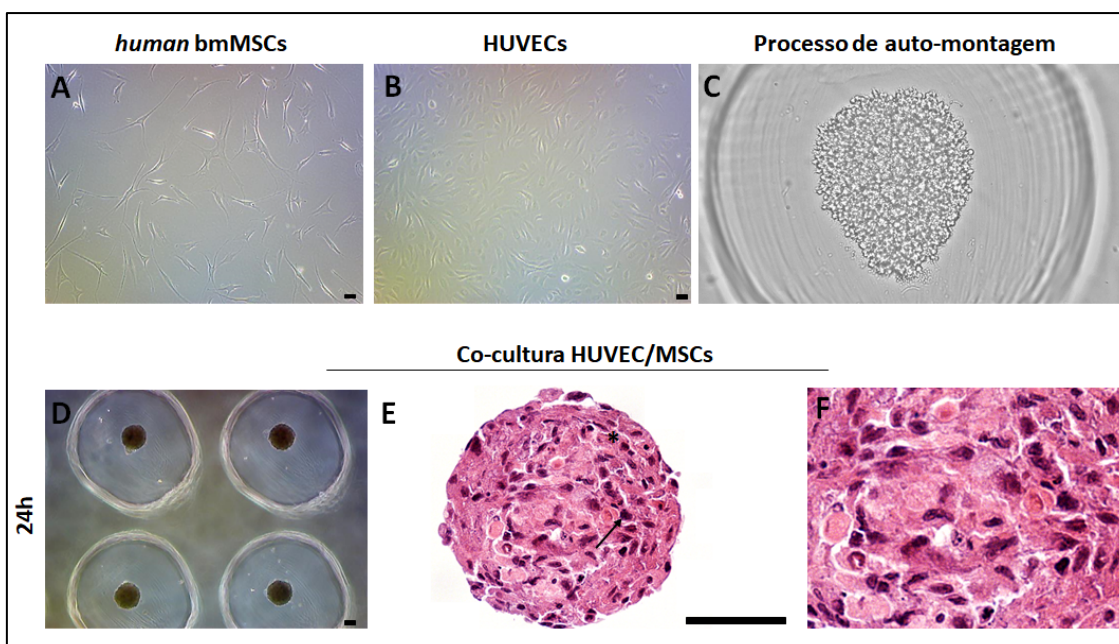


Figura 71: Fabricação de esferoides de co-cultura entre *human* bmMSCs/HUVECs. (A) Cultivo de monocamada de *human* bmMSCs. (B) Cultivo de monocamada das HUVECs. (C) Imagem representativa do processo de auto-montagem dos esferoides de co-cultura após 6 horas do processo de semeadura de células. (D) Imagem representativa dos esferoides de co-cultura formados após 24 h de cultivo. (E, F) Imagem representativa de coloração de Hematoxilina e Eosina do esferoide de co-cultura. Note em (E) que as células no interior dos esferoides apresentam uma morfologia celular arredondada de acordo com o núcleo (seta), enquanto que a morfologia das células na periferia apresenta-se com uma morfologia fibroblastóide de acordo com o núcleo fusiforme (asterisco). Barras de aumento: (A, B e D) 100 μ m; (E) 200 μ m.

A figura 72 apresenta os resultados de medição dos diâmetros maior e menor dos esferoides de co-cultura e o cálculo de esfericidade entre estes diâmetros para todas as proporções de células testadas. Inicialmente, a partir da visualização das imagens de contraste de fase, é possível observar que os esferoides de co-cultura apresentaram diferenças de estabilidade entre si após 24 h de cultivo (Fig. 72). Os esferoides com a proporção de 1MSC:3HUVEC apresentaram células soltas nas ressecções (Fig. 72C) e os esferoides feitos somente de HUVEC apresentaram um formato menos esferoidal quando comparado às outras proporções (Fig. 72D). Os esferoides com as proporções de 3MSC:1HUVEC (Fig. 72A) e 1MSC:1HUVEC foram os que apresentaram

melhor estabilidade de formato, a partir das imagens de contraste de fase obtidas.

A partir dos resultados de medição de diâmetro e esfericidade, foi possível observar diferenças entre as proporções (Fig. 72). Os esferoides com a proporção de 3MSC:1HUVEC apresentaram um valor maior de diâmetro médio quando comparado com as outras proporções (Fig. 72E). Em relação a esfericidade (Fig. 72F), os esferoides de proporção 1MSC:1HUVEC e 3MSC:1HUVEC foram os que apresentaram valores mais próximos à 1, quando comparado às outras proporções (Fig. 72F).

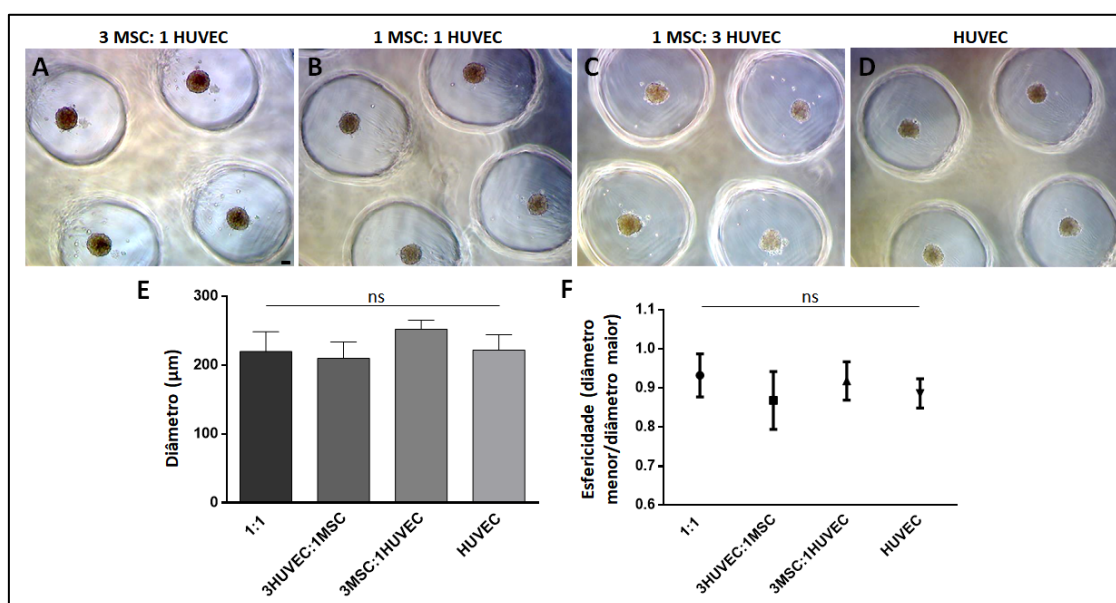


Figura 72: Médias dos diâmetros maior e menor e valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de co-cultura de *human* bmMSC e HUVECs de acordo com diferentes proporções de células. Micrografias de contraste de fase representativa dos esferoides de co-cultura após 24 h de cultivo de acordo com as proporções de células de 3MSC:1HUVEC (A), 1MSC:1HUVEC (B), 1MSC:3HUVEC (C) e HUVEC (D). (E) Média dos valores de diâmetro maior e menor dos esferoides de co-cultura de acordo com as proporções de células após 24 h de cultivo. (D) Valores de esfericidade entre os diâmetros dos esferoides de co-cultura de acordo com as proporções de células após 24h de cultivo. Abreviação: ns – *no statistical difference* (do inglês, sem diferença estatística). Barra de aumento: 100 μm.

Em seguida, a fim de investigar o comportamento funcional dos esferoides vasculares (co-cultura), evidenciado pelo fenômeno de *sprouting* (do inglês, brotamento), nestes esferoides fabricados a partir de diferentes proporções de células, foi feita a semeadura em biotinta de fibrina por até 7 dias em cultura (Fig. 73). As análises por microscopia de fluorescência foram realizadas no período

de 3 dias (Fig. 73 A-D) e no período de 7 dias, correspondente ao final do experimento (Fig. 73 E-H).

No período de 3 dias (Fig. 73 A-D), foi observado um começo do processo de *sprouting* a partir das HUVECs, principalmente na proporção 3MSC:1HUVEC (Fig. 73A, setas). Um indício de *sprouting* também foi observado na proporção 1MSC:1HUVEC (Fig. 73B, seta), porém de forma menos representativa do que quando comparado à proporção de 3MSC:1HUVEC (Fig. 73A). Nas outras proporções de 1MSC:3HUVEC (Fig. 73C) e HUVEC (Fig. 73D) não foi observado *sprouting* (Fig. 73 C, D). Note que os esferoides de co-cultura em ambas as proporções, por mais que estivessem em proximidade, não foram capazes de se fundir (Fig. 73C, seta, D).

Após 7 dias de cultura, as análises de microscopia de fluorescência confirmaram que a proporção de 3MSC:1HUVEC foi a que apresentou um *sprouting* mais evidente quando comparado às outras proporções (Fig. 73E, e-1). Um início de *sprouting* foi observado nas proporções 1:MSC:1HUVEC (Fig. 73F) e 1MSC:3HUVEC (Fig. 73G), mas não foi considerado representativo quando comparado à proporção 3MSC:1HUVEC). Não foi observado *sprouting* nos esferoides de HUVEC e é possível notar, que mesmo em proximidade, estes esferoides não foram capazes de se fundir após 7 dias (Fig. 73H).

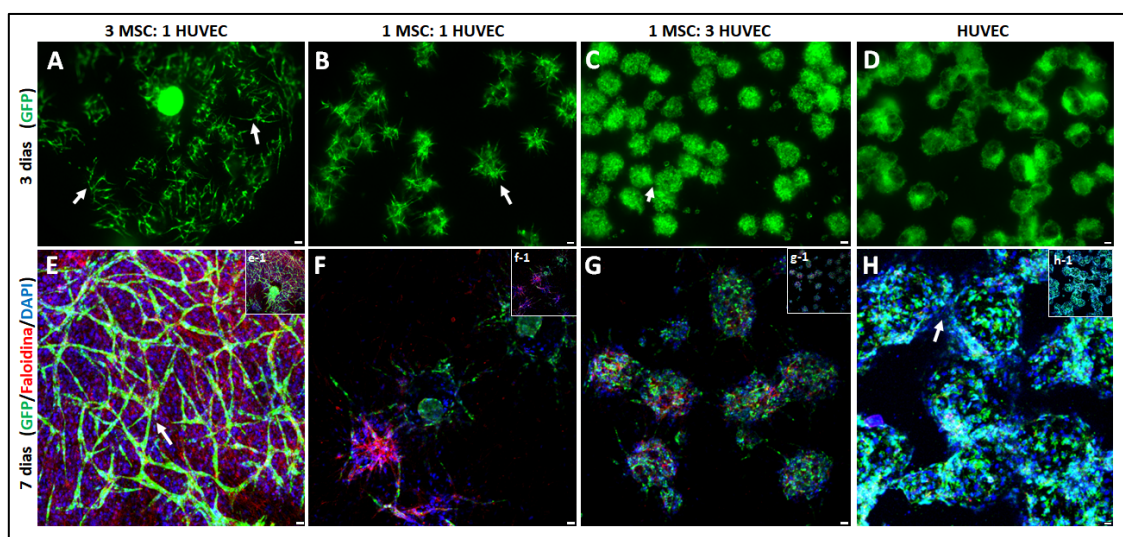


Figura 73: Comportamento funcional dos esferoides vasculares em biotinta de fibrina após 3 e 7 dias em cultivo. (A-D) Micrografias de fluorescência representativas de esferoides vasculares fabricados a partir de diferentes proporções de células semeados em biotinta de fibrina após 3 dias em cultivo. (A) Proporção 3MSC:1HUVEC. Note a presença de sprouting a partir dos esferoides de co-cultura devido à marcação positiva para GFP (seta). (B) Proporção de 1MSC:1HUVEC. Note um indício de sprouting a partir dos esferoides (seta). (C) Proporção 1MSC:3HUVEC. Note que os

esferoides não foram capazes de fundir, mesmo estando em proximidade. (D) Esferoides somente de HUVEC. (E-H) Micrografias de fluorescência representativas de esferoides vasculares fabricados a partir de diferentes proporções de células semeadas em biotinta de fibrina após 7 dias em cultivo. (E, e-1) Proporção 3MSC:1HUVEC. Note a conformação de *sprouting* a partir dos esferoides de co-cultura devido à intensa marcação positiva para GFP (seta). (F, f-1) Proporção de 1MSC:1HUVEC. (G, g-1) Proporção 1MSC:3HUVEC. (H, h-1) Esferoides somente de HUVEC. Note que os esferoides não foram capazes de se fundir, mesmo após 7 dias em cultura (seta). GFP: green fluorescence protein (do inglês, proteína fluorescente verde). Barra de aumento: 100 μ m.

Com o objetivo de investigar o comportamento morfológico e funcional dos esferoides vasculares fabricados a partir da proporção 3MSC:1HUVEC, a qual apresentou melhor *sprouting* (tópico 8.8), foi realizada a semeadura destes esferoides vasculares em diferentes densidades na biotinta de fibrina (Fig. 74). A densidade baixa com um número entre 10 a 20 esferoides (Fig. 74 A, D e G), a densidade média entre 30 a 45 esferoides (Fig. 74 B, E e H) e a densidade alta com mais de 60 esferoides semeados em uma mesma área de biotinta (Fig. 74 C, F e I).

A partir das micrografias de contraste de fase, é possível observar que, de fato, a densidade dos esferoides vasculares semeados foi diferente em uma mesma área (Fig. 74). As imagens representativas em D e F mostram os esferoides vasculares semeados em uma baixa densidade após 24 h e 7 dias de cultivo, respectivamente. As imagens em E e H mostram os esferoides semeados em uma densidade média após 24 h e 7 dias de cultivo, respectivamente. E as imagens em F e I mostram os esferoides semeados em uma densidade alta após 24 h e 7 dias de cultivo, respectivamente.

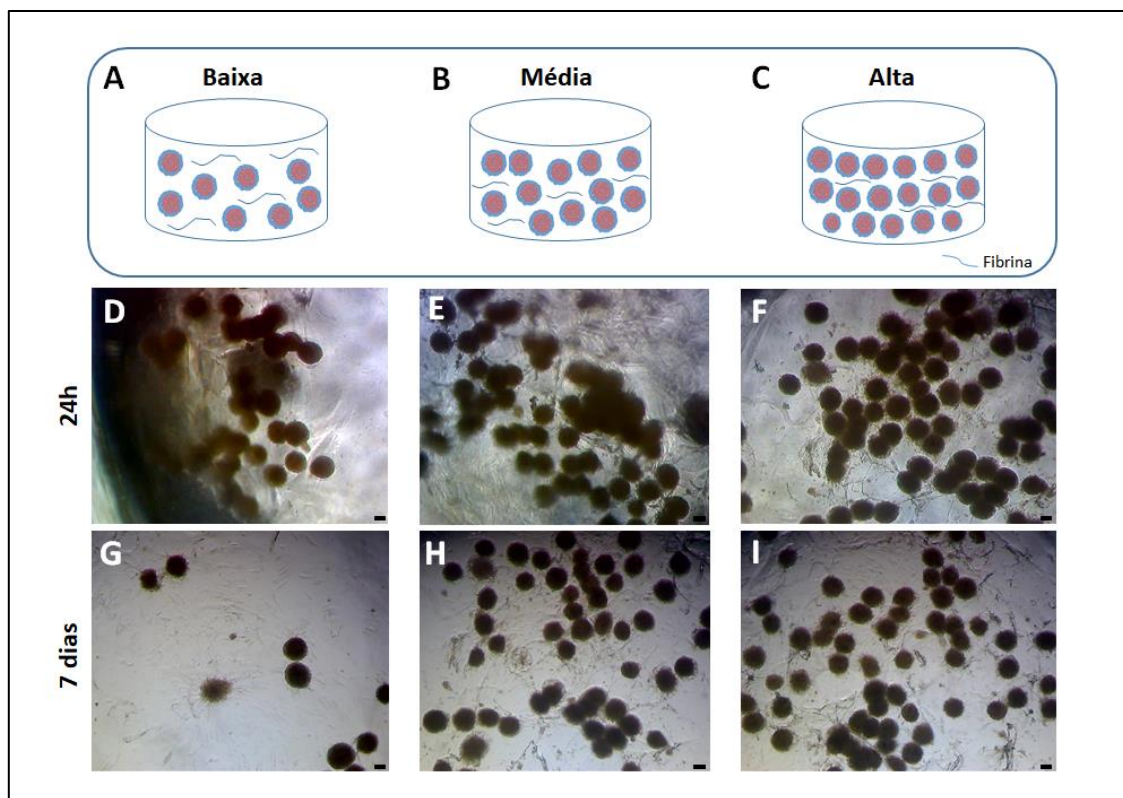


Figura 74: Micrografias de contraste de fase dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVCEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina. (A-C) Esquemas representativos mostrando a semeadura dos esferoides vasculares em três densidades: a baixa (A), a média (B) e a alta (C). As tiras azuis representam a fibrina. (D-F) Micrografias de contraste de fase dos esferoides semeados em uma baixa densidade (D), média (E) e (F) alta após 24h de cultivo. Micrografias de contraste de fase dos esferoides semeados em uma baixa densidade (G), média (H) e (I) alta após 7 dias de cultivo. Barra de aumento: 100 μm .

No período de 3 dias (Fig. 75 A-C), a partir da observação de fluorescência de GFP, foi observado que em uma densidade média, os esferoides vasculares foram capazes de apresentar ramificações e um início do processo de *sprouting* (Fig. 75B, seta). Porém, em uma alta densidade de semeadura, foi observado uma alta intensidade de marcação, uma maior presença de ramificações e um processo mais avançado de *sprouting* (Fig. 75C, setas). Em uma baixa densidade, não foi observado *sprouting* neste período de tempo (Fig. 75A).

No período de 7 dias (D-F), em uma densidade média, foi observado um maior alongamento das ramificações (Fig. 75E, seta) em toda a área de semeadura. Em uma alta densidade, foi observado uma maior quantidade de ramificações, além de um alongamento destas ramificações em algumas áreas (Fig. 75F, seta), o que evidencia uma evolução no processo de *sprouting*. Em

uma baixa densidade de semeadura dos esferoides vasculares, não foi observado *sprouting* (Fig. 75D).

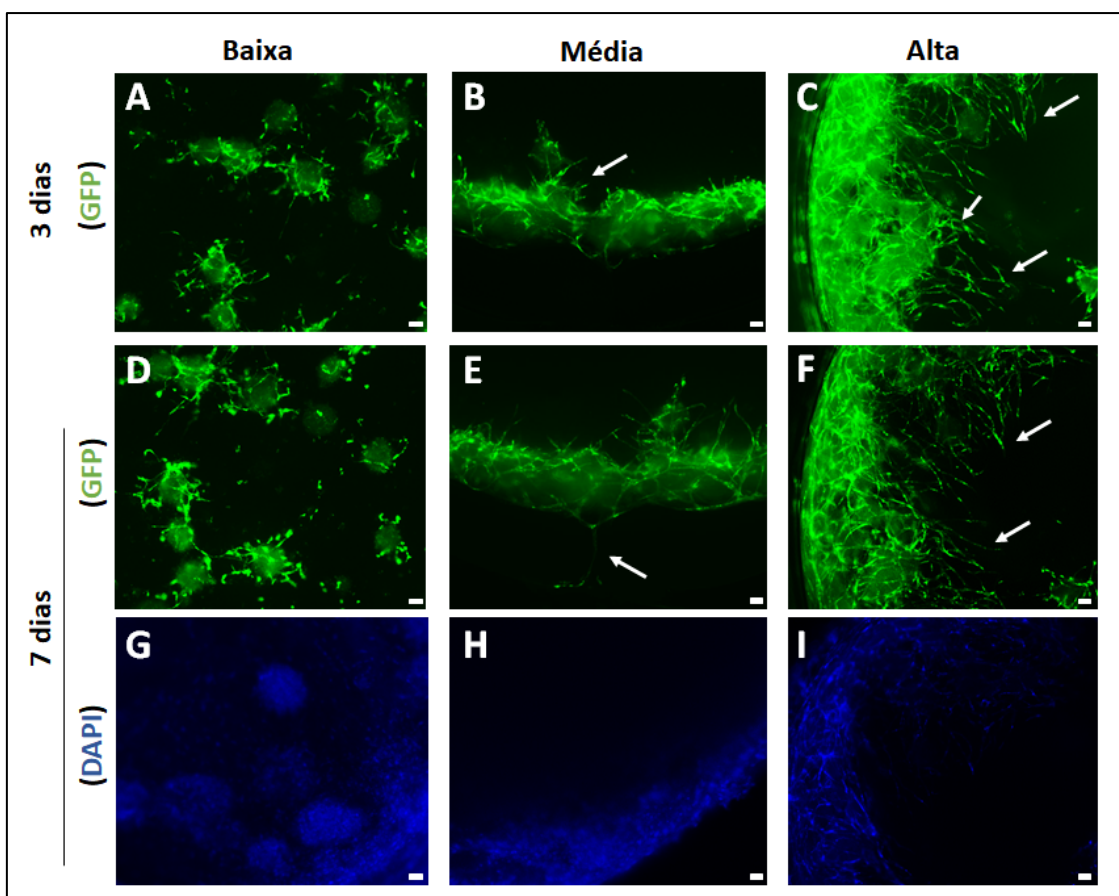


Figura 75: Micrografias de fluorescência dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina. Micrografias de fluorescência dos esferoides semeados em uma baixa (A), média (B) e (C) alta densidade após 3 dias de cultivo. Note a presença de ramificações e o início do processo de *sprouting* nos esferoides semeados em uma densidade média (B, seta). Note a presença de ramificações e alongamentos em uma alta densidade de semeadura dos esferoides vasculares (C, seta). Micrografias de fluorescência dos esferoides semeados em uma baixa (D), média (E) e (F) alta densidade após 7 dias de cultivo. Note o alongamento das ramificações dos esferoides vasculares em uma média densidade (E, seta) e um maior alongamento das ramificações dos esferoides em uma alta densidade (F, seta). Micrografias de fluorescência com marcação de DAPI nos esferoides vasculares semeados em uma baixa (G), média (H) e alta (I) densidade. GFP: *green fluorescence protein* (do inglês, proteína fluorescente verde). Barra de aumento: 100 μ m.

Nas imagens da figura 76 A-C também é possível observar macroscopicamente os hidrogéis de fibrina com os esferoides vasculares semeados em diferentes densidades. No que em uma baixa densidade, os hidrogéis ficaram menos densos e mais transparentes (Fig. 76A), quando

comparado com os hidrogéis que apresentaram uma média (Fig. 76B) e alta densidade de esferoides semeados (Fig. 76C).

A partir da coloração de Hematoxilina e Eosina (Fig. 76 D-I) foi possível notar diferenças morfológicas entre as densidades de esferoides semeadas na biotinta de fibrina. Em uma baixa densidade (Fig. 76 D e G), os esferoides estavam localizados na região mais central do hidrogel. A partir das imagens, é possível notar que os esferoides estavam fusionados entre si. Em uma média densidade (Fig. 76 E e H), os esferoides estavam localizados na região mais periférica do hidrogel, é possível observar uma maior densidade celular e as células parecem estar adentrando no interior do hidrogel (Fig. 76H, seta). Em uma alta densidade (Fig. 76 F e I), é possível observar que a localização preferencial dos esferoides na periferia do hidrogel, uma maior densidade celular e a presença de esferoides individualizados na biotinta (Fig. 76F, seta e I, asterisco). Além disso, também foi notada a presença de células adentrando o hidrogel (Fig. 76I, seta).

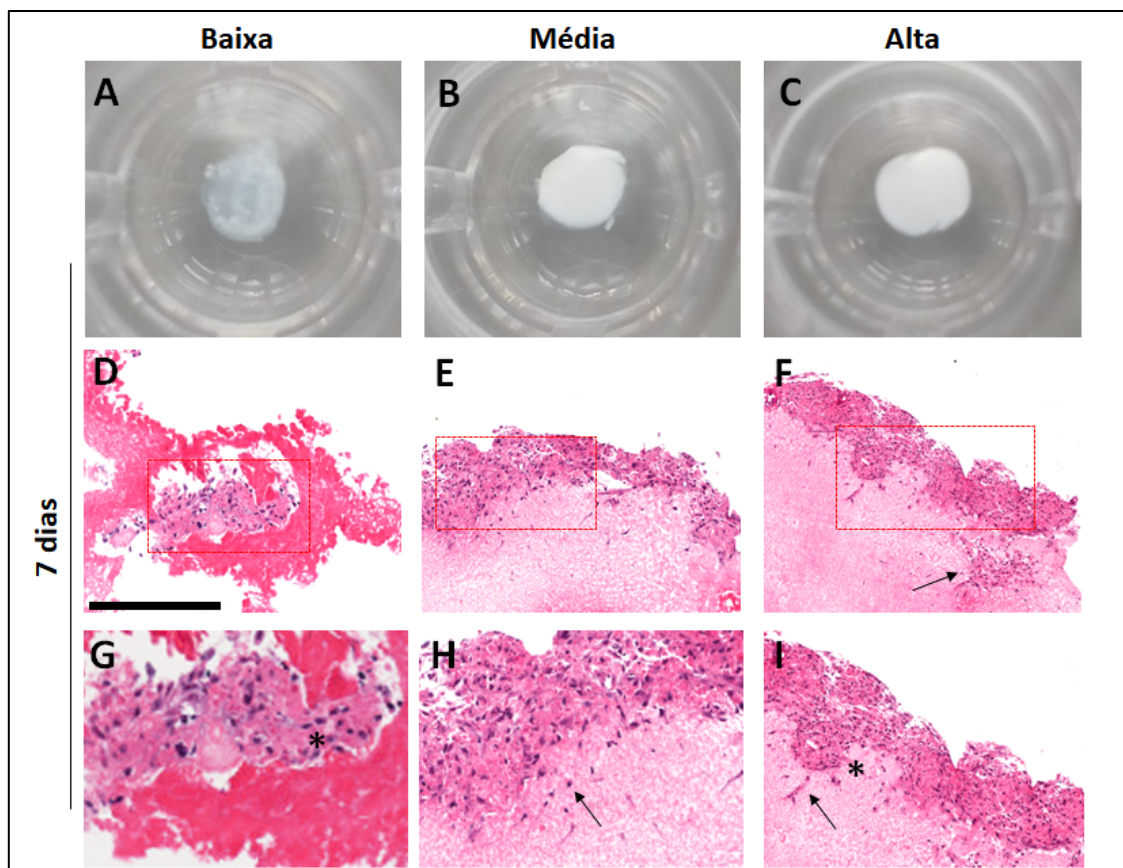


Figura 76: Análise morfológica dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina. (A-C) Imagens macroscópicas dos hidrogéis de fibrina com esferoides semeados em uma baixa (A), média (B) e alta (C) densidade. Coloração por Hematoxilina e Eosina dos esferoides vasculares semeados em uma baixa (D), média (E) e alta (F) densidade. Note em (F) a presença de um esferoide individualizado adentrando no hidrogel de fibrinal (seta). (G) Aumento digital da imagem correspondente à (D). (H) Aumento digital da imagem correspondente à (E). Note em (H) as células adentrando no hidrogel de fibrina (seta). (I) Aumento digital da imagem correspondente à (F). Note em (I) a presença de um esferoide individualizado (asterisco) e células adentrando no hidrogel de fibrina (seta).

Por fim, um dos testes de cultivo para as diferentes densidades dos esferoides vasculares, foi a manutenção das células de bmMSCs e HUVECs em condição de normóxia até atingirem a confluência e subsequente produção dos esferoides na proporção 3MSC:1HUVEC (Fig. 77A). No entanto, após 3 dias de cultivo em diferentes densidades, foi observado macroscopicamente uma baixa densidade de células no hidrogel de fibrina, para todas as densidades testadas (Fig. 77 B-D). Além disso, as análises de microscopia de fluorescência após 3 dias de cultivo mostraram que os esferoides não apresentaram *sprouting* em nenhuma densidade testada (Fig. 77 E-G). Estes esferoides também não foram capazes de se fundir entre si (Fig. 77 E-G).

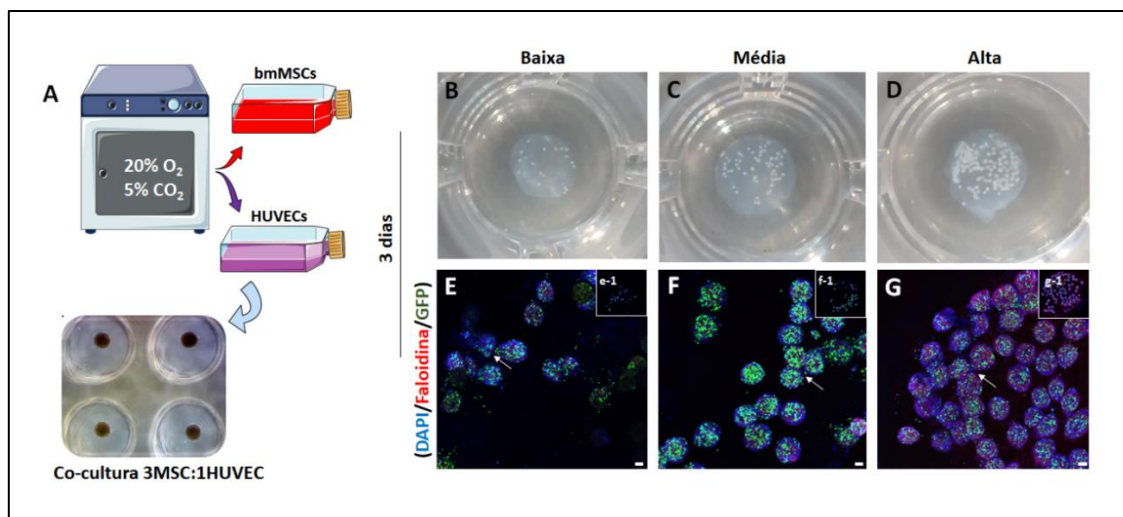


Figura 77: Micrografias de fluorescência dos esferoides vasculares na proporção 3MSC:1HUVEC semeados em diferentes densidades na biotinta de fibrina após 3 dias de cultivo. (A) Esquema representativa do cultivo em monocamada das células de human bmMSCs e HUVECs em condições de normóxia para produção dos esferoides vasculares na proporção de 3MSC:1HUVEC. (B-D) Imagens macroscópicas dos hidrogéis de fibrina com esferoides semeados em uma baixa (B), média (C) e alta (D) densidade após 3 dias de cultivo. Micrografias de fluorescência dos esferoides vasculares semeados em uma baixa (E), média (F) e (G) alta densidade após 3 dias de cultivo. Note que os esferoides mesmo em proximidade não foram capazes de se fundir, como exemplificado na imagem em G, seta. GFP: *green fluorescence protein* (do inglês, proteína fluorescente verde). Barra de aumento: 100 μ m.

7.6 BIOIMPRESSÃO DOS ESFEROIDES VASCULARES EM BIOTINTA DE FIBRINA

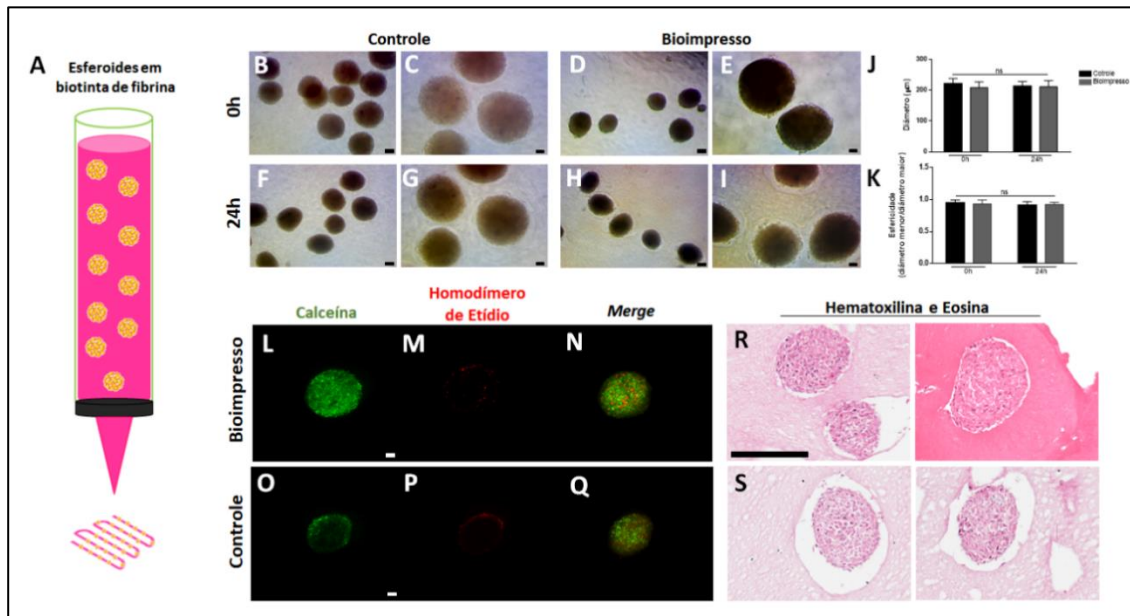
A fim de testar uma estratégia de biofabricação com os esferoides vasculares para aplicações futuras em construídos para o tecido ósseo, foi realizada a bioimpressão desses esferoides em um padrão pré definido utilizando a técnica de extrusão. Em seguida, análises de medição de diâmetro e esfericidade, morfológicas e de viabilidade foram realizadas a fim de avaliar a eficácia do processo de bioimpressão 3D (Fig. 78). Os esferoides bioimpressos em biotinta de fibrina foram comparados com os esferoides semeados manualmente na mesma biotinta por um período logo após a bioimpressão e semeadura manual (período de 0h) e até 24 h de cultivo (Fig. 78 B-S).

Inicialmente, as medições de diâmetro e esfericidade não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os esferoides vasculares bioimpressos e controles em até 24 h de cultivo (Fig. 78 J-K). Ambos os grupos apresentaram uma média de diâmetro no valor de 200 a 210 μ m (Fig. 78J). Em relação a

esfericidade, tanto os esferoides controles, como os bioimpressos, apresentaram um valor de 0,9, o que mostra que ambos apresentaram homogeneidade de tamanho e forma no período de cultivo (Fig. 78K).

As análises de viabilidade celular após 24 h de cultivo (Fig. 78 L-Q), mostraram que os esferoides bioimpressos apresentaram uma alta distribuição e intensidade de marcação para calceína (Fig. 78L) e uma baixa distribuição de homodímero de etídio (Fig. 78M). A marcação positiva para o homodímero de etídio (vermelho: células mortas) ficou preferencialmente localizada na periferia dos esferoides bioimpressos (Fig. 78M). Nos esferoides controles, que foram semeados manualmente na biotinta de fibrina, a intensidade de marcação para calceína (verde: células vivas) também foi elevada, porém a distribuição foi menor em toda a área dos esferoides (Fig. 78O). A marcação positiva para o homodímero de etídio também se localizou preferencialmente na região periférica dos esferoides (Fig. 78P).

A análise histológica para Hematoxilina e Eosina mostrou uma morfologia similar nos esferoides bioimpressos e controles na biotinta de fibrina após 24 h de cultivo (Fig. 78 R e S, respectivamente). No interior dos esferoides de ambos os grupos, as células apresentaram uma morfologia arredonda, o que foi possível detectar de acordo com a observação dos núcleos (Fig. 78 R e S).



7.7 ARCABOUÇOS DE PCL APRESENTAM ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL APÓS PROCESSO DE IMPRESSÃO 3D

A fim de obter dois tipos de arcabouços de PCL para este trabalho, foi realizado o processo de impressão 3D (Fig. 79). O primeiro arcabouço impresso foi para aplicação em implante subcutâneo em camundongos (Fig. 79 A-C). O arcabouço para o implante subcutâneo apresentou um tamanho total de 2 mm de altura e diâmetro e foi composto de 4 camadas de PCL impressas em continuidade com um suporte lateral para fornecer sustentação à cada camada (Fig. 79C). O segundo arcabouço impresso foi para aplicação em defeito ósseo

crítico de fêmur em ratos (Fig. 79 D-F). Este arcabouço apresentou um tamanho total de 5 mm de altura e diâmetro e um total de 8 camadas de PCL impressas também em continuidade com um suporte lateral para garantir sustentação (Fig. 79F).

O processo de impressão 3D para ambos os arcabouços foi considerado repetível, visto que em um mesmo dia de impressão, realizado pelo mesmo manipulador e com os mesmos parâmetros do equipamento, a qualidade e características estruturais dos arcabouços se mantiveram como era o esperado (Fig. 79G).

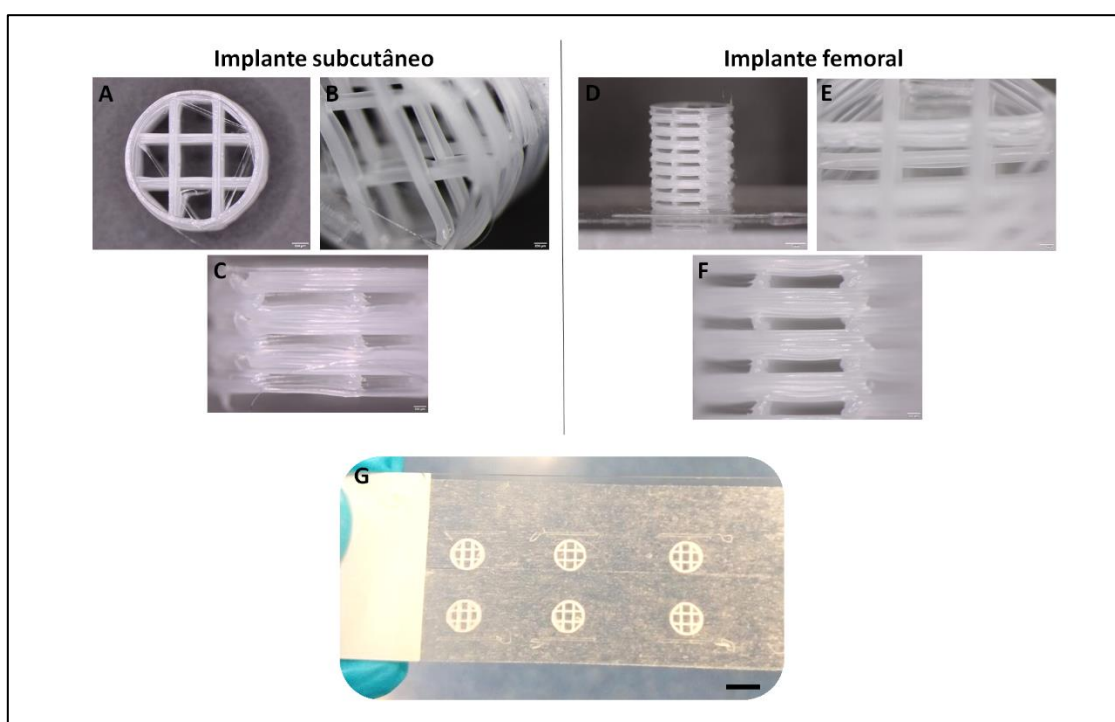


Figura 79: Imagens representativas dos arcabouços impressos 3D de PCL. (A-C) Arcabouço 3D impresso para aplicação em defeito subcutâneo em camundongos. (D-F) Arcabouço 3D impresso para aplicação em defeito ósseo crítico em fêmur de ratos. Note em (C) e (F) as estruturas de suporte impressas no arcabouço para garantir sustentação aos arcabouços após o processo de impressão 3D. (G) Imagem representativa de vários arcabouços 3D impressos de PCL com o tamanho total de 2 mm obtidos em um mesmo dia, pelo mesmo manipulador e utilizando os mesmos parâmetros do equipamento. Barras de aumento: (A) 500 μ m; (B-C) 200 μ m; (D) 1 mm; (E-F) 200 μ m; (G) 2 mm.

7.8 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS ENGENHEIRADOS A PARTIR DE ESFEROIDES HIPERTRÓFICOS E ESFEROIDES VASCULARES COMO ABORDAGEM PARA ENGENHARIA ÓSSEA

7.8.1 Semeadura dos esferoides hipertróficos e vasculares no arcabouço 3D impresso de PCL

A fim de visualizar a interação entre os esferoides hipertróficos e vasculares com o arcabouço 3D impresso de PCL, imagens de contraste de fase e macroscópicas foram obtidas ao longo do período de cultura (Fig. 80). No esquema representativo apresentado na figura 87A, é possível observar um resumo da estratégia do cultivo. Em ambos, os esferoides hipertróficos foram semeados ao redor do arcabouço 3D impresso de PCL e um dos grupos apresentou esferoides vasculares semeados no canal central do arcabouço (Fig. 80A). Os esferoides semeados no canal central em conjunto com os esferoides hipertróficos ao redor representam um construído para mimetizar a complexa estrutura do tecido ósseo (Fig. 80A). Ambos os arcabouços foram mantidos com as mesmas condições experimentais até o final do período de cultivo.

A micrografia de contraste de fase na figura 80B mostra os esferoides completamente fusionados após 2 semanas de cultivo em meio indutor condrogênico no arcabouço de PCL. Note na figura o canal central vazio, correspondente ao grupo que não recebeu esferoides vasculares. Em seguida, os construídos permaneceram por 1 semana em meio hipertrófico, onde ainda foi possível observar todos os esferoides fusionados no arcabouço de PCL (Fig. 80C). Por fim, os construídos permaneceram por 1 semana em meio EGM-2 (Fig. 80 D e G), totalizando 4 semanas de cultivo. Note na imagem macroscópica na figura 80D que o construído apresenta uma alta densidade de células. Na figura 80E, é possível observar o grupo que recebeu os esferoides vasculares no canal central após 1 dia do processo de semeadura destes esferoides em biotinta de fibrina. Após 1 semana em meio EGM-2, os esferoides vasculares ainda estavam localizados no canal central do arcabouço (Fig. 80F, marcação vermelha e G).

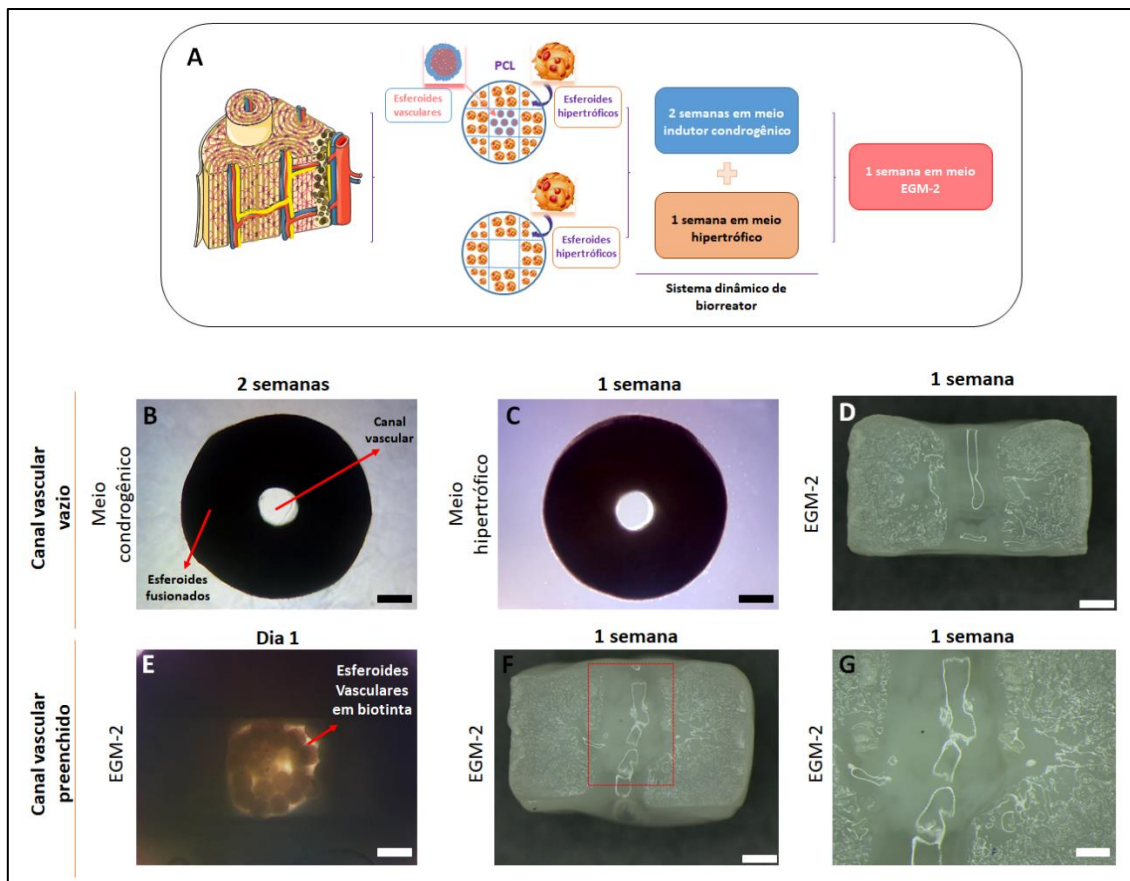


Figura 80: Semeadura dos esferoides hipertróficos e vasculares no arcabouço 3D impresso de PCL. (A) Esquema representativo da estratégia experimental para o desenvolvimento de um construído para mimetizar a complexidade estrutural do tecido ósseo. Ambos os grupos foram mantidos nas mesmas condições de cultivo. (B) Micrografia de contraste de fase dos esferoides completamente fusionados no arcabouço 3D impresso de PCL após 2 semanas de indução condrogênica. Note o canal vascular vazio. (C) Micrografia de contraste de fase dos esferoides completamente fusionados no arcabouço 3D impresso de PCL após 1 semana em meio de indução hipertrófico. Note que os esferoides encontram-se aderidos no arcabouço. (D) Imagem macroscópica do construído após 1 semana em meio EGM-2. (E) Esferoides vasculares semeados na biotinta de fibrina no canal central do arcabouço após 1 dia de cultivo. (F) Imagem macroscópica dos esferoides vasculares após 1 semana de cultivo em meio EGM-2. Note o retângulo em vermelho demarcando o canal central com os esferoides semeados. (G) Aumento digital dos esferoides vasculares no interior do canal central do arcabouço de PCL após 1 semana em meio EGM-2. EGM-2: *endothelial cell growth medium-2* (do inglês, meio de crescimento de células endoteliais). Barras de aumento: 500 µm.

7.8.2 Análise morfológica dos construídos revela alta intensidade de marcação e distribuição de componentes da matriz extracelular cartilaginosa após 2 semanas em meio indutor condrogênico

A partir da coloração por Hematoxilina e Eosina (Fig. 81 A-D), foi observada uma alta densidade de células provenientes do fusionamento dos

esferoides em toda a área do arcabouço de PCL. Majoritariamente, as células apresentaram uma morfologia arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 81B, seta). Nas imagens também é possível observar espaços virtuais em branco correspondente aos poros do arcabouço de PCL.

A partir da coloração por Alcian *Blue* (Fig. 81 E-H), foi observada uma alta intensidade de marcação e distribuição para sGAG em toda a região dos construídos (Fig. 81 E-H). A coloração por Picrossirius *Red* (Fig. 81 I-L) revelou uma alta intensidade de marcação para fibras colágenas principalmente na região periférica do construído (Fig. 81I, seta). Por fim, foi possível observar que os construídos apresentaram uma marcação majoritariamente negativa para coloração de Alizarina vermelha (Fig. 81 M-P), com exceção de algumas regiões positivas próximas aos espaços virtuais do arcabouço de PCL (Fig. 81M, setas).

7.8.3 Análise morfológica dos construídos revela alta intensidade de marcação e distribuição de componentes da matriz extracelular cartilaginosa e marcação positiva para Alizarina vermelha após 1 semana em meio hipertrófico

A partir da coloração por Hematoxilina e Eosina (Fig. 82 A-D), foi observada uma manutenção da alta densidade de células provenientes do fusionamento dos esferoides em toda a área do arcabouço de PCL. Majoritariamente, as células apresentaram uma morfologia arredondada, que pode ser visualizada pela observação dos núcleos (Fig. 82A, seta). Nestas imagens também é possível observar espaços virtuais em branco correspondente aos poros do arcabouço de PCL (Fig. 82).

A partir da coloração por Alcian *Blue* (Fig. 82 E-H), foi observada uma maior intensidade de marcação para sGAG em toda a região dos construídos (Fig. 82 E-H) quando comparado com 2 semanas do período de condrogênese (Fig. 82 E-H). A coloração por Picrossirius *Red* (Fig. 82 I-L) revelou uma maior intensidade de marcação para fibras colágenas somente na região periférica do construído (Fig. 82I, seta). Por fim, foi possível observar que os construídos apresentaram uma marcação positiva e de maior intensidade para coloração de

Alizarina vermelha em toda a região da periferia do arcabouço de PCL (Fig. 82 M-P).

Além das análises histológicas, a análise bioquímica realizada mostrou que o construído contendo o canal vascular preenchido apresentou uma elevada quantidade de sGAG/DNA, no valor de 65 μg (Fig. 82Q), o que pode ser justificado justamente pela alta densidade celular no construído.

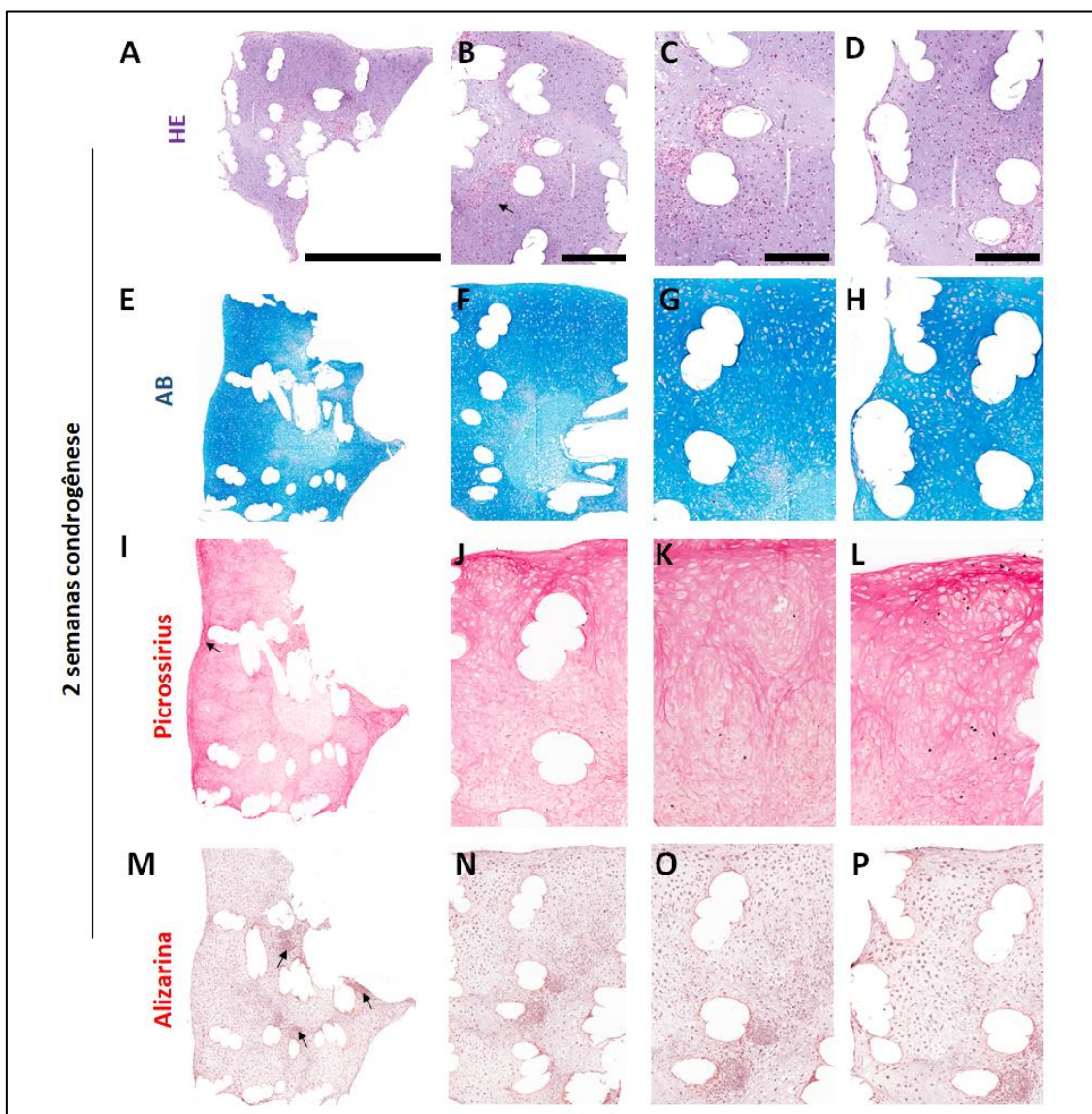


Figura 81: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos construídos induzidos em meio condrogênico após 2 semanas de cultivo. (A-D) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Note a morfologia das células arredondada em toda a extensão do construído (B, seta) (E-H) Coloração por Alcian Blue. (I-L) Coloração por Picrossirius Red. Note uma maior intensidade de marcação na região periférica dos esferoides (I, seta). (M-P) Coloração por Alizarina vermelha. Note uma maior intensidade de marcação nas regiões próximas às áreas virtuais do arcabouço de PCL (M, setas). HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian Blue. Barras de aumento: (A) 2 mm; (B) 600 μm ; (C e D) 400 μm .

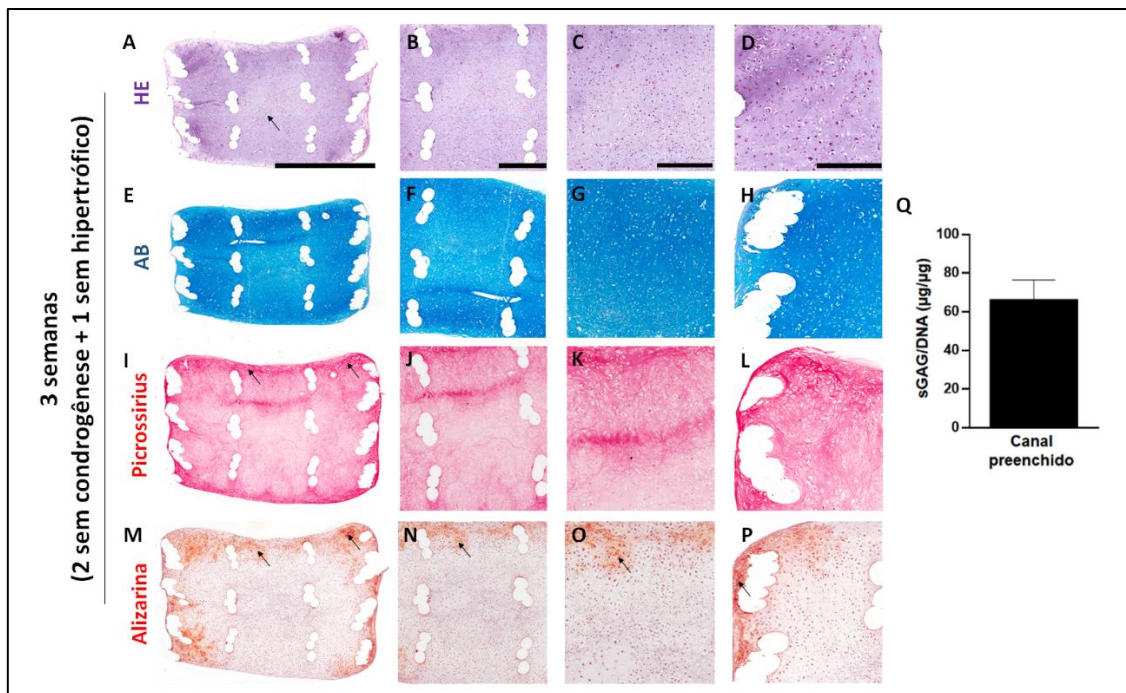


Figura 82: Coloração por Hematoxilina e Eosina, Alcian Blue, Picrossirius Red e Alizarina vermelha dos construídos induzidos em meio hipertrófico após 1 semana de cultivo. (A-D) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Note a morfologia das células arredondada em toda a extensão do construído (B, seta) (E-H) Coloração por Alcian Blue. (I-L) Coloração por Picrossirius Red. Note uma maior intensidade de marcação na região periférica dos esferoides (I, seta). (M-P) Coloração por Alizarina vermelha. Note uma maior intensidade de marcação nas regiões próximas às áreas virtuais do arcabouço de PCL (M, setas). (Q) Quantificação total de sGAG/DNA dos esferoides induzidos. Sem: semana; HE: Hematoxilina e Eosina; AB: Alcian Blue. Barras de aumento: (A) 2 mm; (B) 600 µm; (C e D) 400 µm.

A fim de analisar a morfologia do construído com o canal vascular não preenchido, foram realizadas análises por microscopia de fluorescência (Fig. 83). As imagens revelaram uma alta densidade de células em toda a extensão do arcabouço (Fig. 83). Estas células apresentaram-se majoritariamente com a morfologia celular arredondada, devido ao formato do núcleo (Fig. 83C, seta). Foi possível observar que houve uma maior intensidade de marcação de faloidina na região das bordas do arcabouço (Fig. 83A, seta). E como já havia sido observado previamente pelas análises histológicas, também foi possível notar por microscopia de fluorescência os espaços virtuais correspondentes aos poros do arcabouço (Fig. 83B, seta).

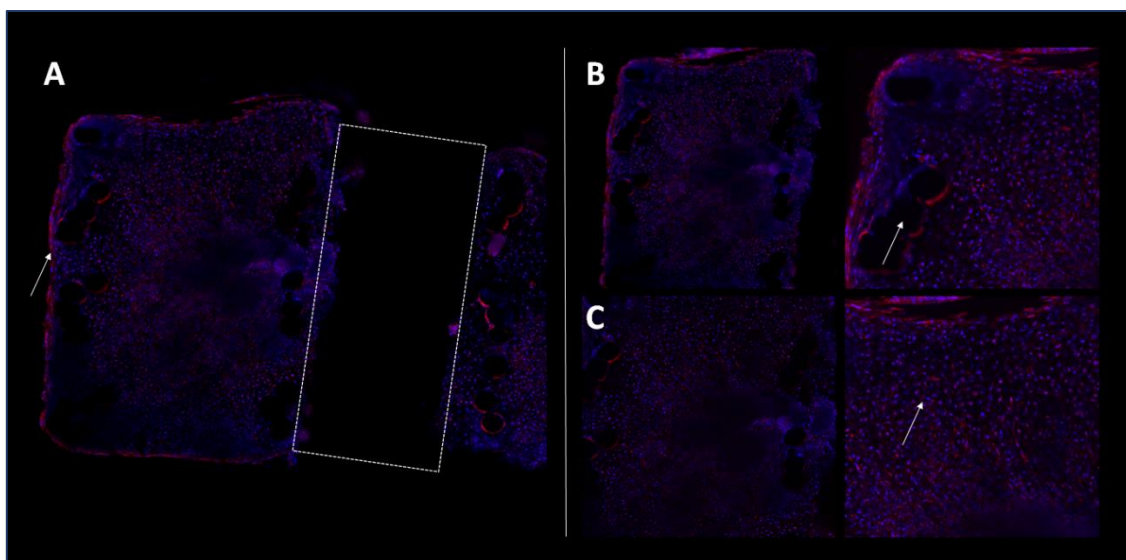


Figura 83: Micrografias de fluorescência dos construídos com o canal não preenchidos mantidos em meio indutor condrogênico por 2 semanas e meio indutor hipertrófico por 1 semana de cultivo. (A) Micrografia de fluorescência da área total do arcabouço de PCL com o canal vascular não preenchido e demarcado por um retângulo em branco. Note a maior intensidade de marcação de faloidina na superfície do arcabouço (seta). (B) Visualização lateral do arcabouço de PCL. Note os espaços virtuais correspondentes aos poros do arcabouço de PCL (seta). (C) Micrografia fluorescência da área central do construído. Note que as células apresentam em sua maioria uma morfologia arredondada (seta).

7.9 IMPLANTE SUBCUTÂNEO DOS CONSTRUÍDOS ENGENHEIRADOS

7.9.1 Análise macroscópica das amostras dos construídos pós implante

Inicialmente, após o final do período de implante na região subcutânea de camundongos, foram obtidas imagens macroscópicas da região do implante, em que se localizavam os construídos dos grupos: arcabouço de PCL sem esferoides semeados (Fig. 84A), arcabouço de PCL com canal vascular não preenchido (Fig. 84B) e arcabouço de PCL com canal vascular preenchido (Fig. 84C).

A partir das imagens, é possível observar que o grupo correspondente ao PCL sem esferoides semeados, apresentou uma menor produção de tecido em sua volta e no interior do arcabouço, quando comparado com os grupos com o canal vascular não preenchido e preenchido (Fig. 84A). O grupo com o canal vascular não preenchido, apresentou uma produção tecidual considerável ao redor do arcabouço, de forma que não é possível visualizar o arcabouço polimérico, somente o tecido formado (Fig. 84B). De forma similar, o grupo

contendo os esferoides vasculares semeados no canal central apresentou uma considerável produção tecidual, porém, aparentemente, com uma menor quantidade no arredor da região do arcabouço, quando comparado com o grupo em que não houve esferoides vasculares semeados no canal central (Fig. 84C). Em algumas amostras do grupo contendo o canal vascular preenchido, é possível observar os esferoides vasculares semeados no interior do canal (Fig. 84C, seta).

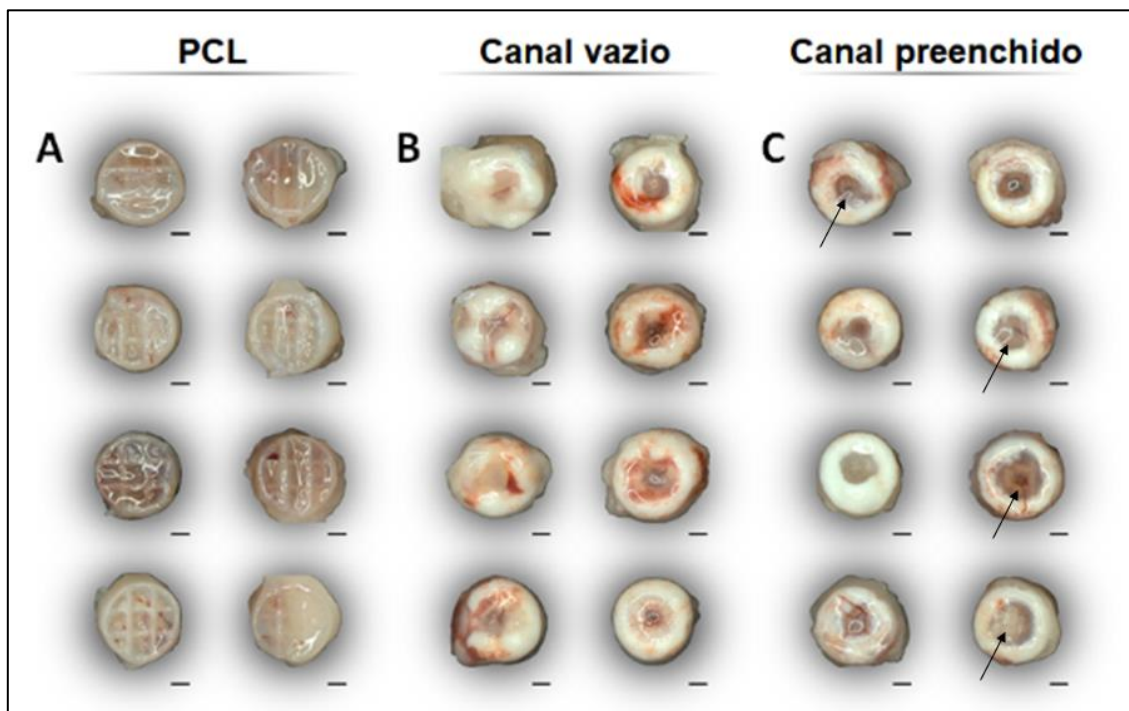


Figura 84: Imagens macroscópicas dos grupos experimentais após o período de implante em defeito subcutâneo em camundongos. (A) Amostras do grupo do arcabouço de PCL sem esferoides semeados. (B) Amostras do grupo com o canal vascular não preenchido, somente com esferoides hipertróficos ao redor. (C) Amostras do grupo com o canal preenchido por esferoides vasculares no canal central. Note nas amostras estes esferoides semeados no interior do canal. Barra de aumento: 500 µm.

8. DISCUSSÃO

8.1 PROPRIEDADES MORFO-FUNCIONAIS DOS ESFEROIDES DE bmMSCs e ASCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA

8.1.1 Os esferoides de MSCs adquirem propriedades funcionais *in vitro* relacionados a via hipertrófica

Neste trabalho, esferoides de ASCs foram induzidos para a via hipertrófica e a eficácia do processo de diferenciação *in vitro* foi avaliada de acordo com características morfofuncionais. Os resultados principais mostram que os esferoides de ASCs foram capazes de recapitular os principais eventos moleculares e um perfil de mediadores secretados que orquestram o desenvolvimento de uma cartilagem hipertrófica.

Com o avanço e aprimoramento das técnicas de cultivo 3D, o número de estudos realizados com esferoides derivados de ASCs e bmMSCs para abordagens em engenharia óssea aumentaram expressivamente nos últimos anos. No entanto, o número de estudos com esferoides fabricados a partir de ASCs ainda é menor quando comparado com os estudos feitos com bmMSCs (BAPTISTA *et al.*, 2018). As ASCs apresentam diferentes vantagens para uso em cultivo celular, como por exemplo: 1) fácil acesso no momento da coleta; 2) é possível obter uma alta densidade de células após o isolamento; 3) são capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica mesodermis (BAPTISTA *et al.*, 2009). Por conta disso, essas células são consideradas fontes interessantes para abordagens em Engenharia de Tecidos.

Neste trabalho, esferoides de ASCs foram inicialmente avaliados de acordo com sua homogeneidade de tamanho e forma. É importante destacar que esse parâmetro precisa ser considerado após a fabricação de esferoides a partir do cultivo 3D, principalmente para aplicação dos esferoides como blocos de construção teciduais (MIRONOV *et al.*, 2009). Os esferoides não induzidos e induzidos de ASCs para a via hipertrófica, apresentaram um tamanho e forma reprodutíveis. É sabido que os esferoides MSCs ou ASCs com faixa de diâmetro entre 400-500 μm , geralmente não apresentam redução na viabilidade celular

(KAPUR *et al.*, 2012; BARANIAK *et al.*, 2012), o que está de acordo com os resultados apresentados neste trabalho.

Por mais que o número de estudos com esferoides de ASCs tenha aumentado nos últimos anos (COLLE *et al.*, 2020; FITZGERALD *et al.*, 2020; KRONEMBERGER *et al.*, 2020), nenhum artigo foi publicado até o momento com essas células para o desenvolvimento de uma cartilagem hipertrófica como estratégia para o reparo ósseo. A hipertrofia é um estágio decisivo para a formação óssea no processo de ossificação endocondral. Durante a hipertrofia do molde cartilaginoso, os condrócitos aumentam consideravelmente de volume ao mesmo tempo em que secretam matriz extracelular, a qual irá começar a tornar-se mineralizada. Esse processo requer uma regulação controlada por fatores de transcrição e proteínas secretadas pela matriz extracelular. Uma dessas proteínas é a enzima MMP-13, responsável por degradar componentes típicos da matriz extracelular da cartilagem, como colágeno II e agregana, para futura substituição em matriz óssea mineralizada (MACKIE *et al.*, 2008). Além do MMP-13, o colágeno X é uma proteína secretada pelos condrócitos hipertróficos durante a ossificação endocondral e regula positivamente o processo de mineralização (SHEN, 2005). Outro fator chave para esse processo e crescimento ósseo é o VEGF. O VEGF é altamente secretado pelos condrócitos hipertróficos e é responsável por induzir a angiogênese, apoptose dos condrócitos, invasão vascular e formação óssea na placa de crescimento (GERBER *et al.*, 1999; SATIL *et al.*, 2012).

Dentre as análises funcionais realizadas nos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos para a hipertrofia, a análise de expressão gênica mostrou que os esferoides induzidos apresentam uma alta regulação dos genes COLXA1 (colágeno X tipo A1) e MMP-13 na segunda semana de indução, o que suporta o desenvolvimento de um fenótipo de cartilagem hipertrófica *in vitro* (SAITO *et al.*, 2010; DY *et al.*, 2011; NAKATANI *et al.*, 2016; NASRABADI *et al.*, 2018).

Outra análise funcional realizada neste trabalho, foi a quantificação de mediadores secretados por esferoides de ASCs não induzidos e induzidos. A capacidade secretora de mediadores solúveis por esferoides de MSCs e ASCs (POTAPOVA *et al.*, 2007; FURUHATA *et al.*, 2016; OBERRINGER *et al.*, 2018; REDONDO-CASTRO *et al.*, 2018), o que demonstra que o cultivo 3D é dinâmico e funcional. Em destaque, o nível de IL-6, VEGF, IL-8, IL-10, bFGF e RANTES

foram mais elevados na segunda semana de cultivo dos esferoides de ASC induzidos. O papel do IL-6 do processo de osteogênese já foi descrito recentemente (BASTIDAS-CORAL *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2018). Essa citocina, dentre outras funções, estimula a diferenciação osteoblástica e influencia positivamente a formação óssea (BASTIDAS-CORAL *et al.*, 2016 e HUANG *et al.*, 2018). O VEGF, como descrito previamente, é essencial para o desenvolvimento esquelético (MAES *et al.*, 2010) e sua maior secreção na segunda semana de indução, corrobora com a maior expressão encontrada para esse gene neste trabalho. A citocina IL-8 estimula a angiogênese *in vivo*, conforme descrito anteriormente (WANG *et al.*, 2015; HERRERO *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2018), enquanto a IL-10 favorece a hipertrofia dos condrócitos durante a ossificação endocondral (JUNG *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2018). Além disso, o nível mais alto de secreção de VEGF e IL-10 na segunda semana de indução em esferoides de ASCs induzidos pode estar relacionado com a alta regulação gênica de COLXA1 e MMP-13. Em adição, assim como o VEGF, o bFGF também é pró-angiogênico (HE *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2017). Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho apontam que os esferoides induzidos de ASCs estejam seguindo para a via hipertrófica. É interessante destacar que a alta secreção de fatores pró-angiogênicos pode ser interessante para o reparo ósseo *in vivo*.

A análise de biomecânica dos esferoides é uma outra forma interessante de avaliar sua funcionalidade. Nessa análise, foi realizada a quantificação da resistência mecânica a compressão dos esferoides. Para avaliação biomecânica, o módulo de Young (Y) é uma das medidas mais utilizadas na literatura atual. Por definição, o módulo de Young é uma grandeza física relacionada à elasticidade linear de um material, sendo capaz de determinar, portanto, sua rigidez (HESSEL, *et al.*, 2016). Estudos já reportaram que o osso trabecular apresenta um alto valor de módulo de Young em seu interior (WU *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi observado que esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia apresentaram um valor de módulo de Young significativamente maior na segunda e terceira semana de indução, quando comparado com os esferoides não induzidos.

Até o momento, poucos trabalhos investigaram as propriedades biomecânicas em esferoides individualizados e para o nosso conhecimento,

somente o nosso trabalho foi publicado mostrando as propriedades de esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia (KRONENBERGER *et al.*, 2020). Com os trabalhos publicados até o momento, acredita-se que são as modificações na matriz extracelular dos esferoides que influenciam as alterações nas suas propriedades biomecânicas (PILLET *et al.*, 2017; OMELYANENKO *et al.*, 2020). Um exemplo é que é sabido que durante a síntese do osteoíde (matriz extracelular óssea não calcificada), a quantidade relativa de colágeno IV é reduzida, enquanto a síntese de colágeno I é aumentada. Em relação as propriedades biomecânicas, é esperado que o colágeno não calcificado do tipo I tenha uma resistência mecânica menor às forças de compressão do que o colágeno do tipo IV (PILLET *et al.*, 2017) o que é provavelmente o motivo pelo qual neste trabalho foi observada uma diminuição da resistência à compressão de esferoides hipertróficos em cinco semanas.

No caso da tensão superficial, foi observado o mesmo comportamento do módulo de Young, de forma que os esferoides induzidos para a hipertrofia, apresentaram um maior valor de tensão superficial após duas e três semanas de indução. A tensão superficial é uma medida que representa a adesão das células e das células com a matriz extracelular. Ou seja, quanto maior o valor de tensão superficial, maior é a interação de adesão entre as células e seus componentes (BEATRICE *et al.*, 2018). Dessa forma, o motivo da tensão superficial ter apresentado uma redução em cinco semanas de indução, pode estar relacionado a uma maior resistência mecânica dos esferoides e ao processo de fusão, como será discutido nos próximos tópicos.

O comportamento viscoelástico em esferoides já é considerado bem estabelecido na literatura (FORGACS *et al.*, 1998; PREZIOZI *et al.*, 2010). No entanto, para o nosso conhecimento, neste trabalho foi a primeira vez que foram apresentados resultados do comportamento mecânico de esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia. Foi observado que o primeiro ciclo de compressão dos esferoides induzidos mostrou uma deformação plástica que não apareceu nos ciclos de compressão subsequentes. O motivo desse resultado pode ser por esses esferoides apresentarem uma rigidez inicial próxima à característica de um corpo rígido no início do processo de calcificação. O primeiro ciclo de compressão "quebra" essas estruturas enrijecidas e, depois disso, os esferoides induzidos retomaram seu comportamento viscoelástico usual. Foi observado que

o primeiro pico tem uma resistência mecânica muito alta, no caso dos esferoides induzidos e, portanto, esses esferoides apresentam uma rigidez maior. Dessa maneira, as diferenças entre os esferoides induzidos e não induzidos no primeiro pico de compressão são devido aos indicativos da deformação plástica nos esferoides induzidos. De fato, neste trabalho, foi observado que os esferoides induzidos apresentam sinais de cristalização por MET. Porém, testes futuros serão necessários para comprovar essa hipótese.

No caso de esferoides de bmMSCs, o número de estudos encontrado na literatura até o momento é maior do que com ASCs. Em relação a abordagens para engenharia óssea, estudos com esferoides de bmMSCs já foram realizados e inclusive um modelo baseado em hipertrofia já foi publicado, a fim de mimetizar eventos da ossificação endocondral (MURAGLIA *et al.*, 2003). A principal vantagem em se utilizar bmMSCs para estudos com engenharia óssea é devido ao nicho que essas células se encontram, no interior de ossos longos, e por conta disso, essas células recebem um maior estímulo de sinais bioquímicos das células desse microambiente, os quais por sua vez, favorecem a diferenciação osteogênica (BIRMINGHAM *et al.*, 2012). Neste presente trabalho, foi realizada a indução para hipertrofia em esferoides fabricados a partir de bmMSCs como estratégia para engenharia óssea e sua eficácia foi avaliada a partir de análises morfológicas e bioquímicas.

É importante destacar que a partir da técnica utilizada para produzir os esferoides de bmMSCs, também baseada em hidrogel de agarose micromoldado, foi possível obter um total de 401 esferoides homogêneos em tamanho e forma. Enquanto isso, a partir da técnica utilizada para produzir os esferoides de ASCs, foi possível obter um total de 81 esferoides. O maior número de esferoides obtidos é uma vantagem para abordagens em Engenharia de Tecidos e para a técnica de bioimpressão 3D, onde um alto número de esferoides ou estruturas modulares é necessária para biofabricação de modelos teciduais mais complexos (MIRONOV *et al.*, 2011).

Neste trabalho, foram utilizados dois protocolos diferentes de indução a hipertrofia a partir de esferoides de bmMSCs. No primeiro protocolo, cada esferoide foi composto por 2.000 células e o período de indução utilizado foi 3 semanas de condrogênese e 1 semana de hipertrofia. Esses esferoides apresentaram uma média de diâmetro de 180 μm e homogeneidade de tamanho

e forma. As análises histológicas mostraram uma baixa intensidade de marcação para componentes tipicamente encontrados na matriz extracelular cartilaginosa em três semanas, confirmado pela quantificação bioquímica de sGAG total. Após uma semana de hipertrofia, houve a marcação positiva para depósitos de cálcio na periferia dos esferoides. Em relação ao processo de diferenciação, o esperado seria uma maior eficácia a partir de três semanas, com aumento do diâmetro dos esferoides, seguido por maior intensidade de marcação de componentes da matriz extracelular da cartilagem, como foi observado nos estudos de LAM e colaboradores (2018) e DE MOOR e colaboradores (2020). Nesses estudos, os autores mostraram resultados, a partir de análises histológicas e moleculares, que suportam uma eficácia na diferenciação condrogênica em esferoides de bmMSCs a partir de três semanas de cultivo.

No segundo protocolo testado neste trabalho, foram fabricados esferoides contendo 4.000 células, os quais foram mantidos por 2 semanas em meio condrogênico e 1 semana em meio hipertrófico. Porém, o objetivo dessa estratégia era a semeadura desses esferoides logo após formados, no arcabouço 3D impresso de PCL, como será discutido nos tópicos a seguir. A fim de avaliar se a diferenciação estaria sendo eficaz nos construídos em cultivo, foi feita uma avaliação da eficácia da diferenciação condrogênica em paralelo nos esferoides de bmMSCs induzidos até 2 semanas em meio condrogênico. Os resultados mostraram que os esferoides apresentaram aumento em sua média de diâmetro, para 500 μm , alta intensidade de marcação para componentes da matriz extracelular cartilaginosa e maior quantidade de sGAG total após duas semanas em cultivo. Esses resultados estão de acordo com os estudos publicados por MARKWAY e colaboradores (2010), LAM e colaboradores (2018) e DE MOOR e colaboradores (2020), o que suporta uma maior eficácia no processo de indução condrogênica nos esferoides de bmMSCs.

A principal diferença entre os dois protocolos testados foi a quantidade total de bmMSCs utilizadas para a fabricação dos esferoides. De fato, é sabido que esferoides com uma média maior de diâmetro, em torno de 400 μm , podem recapitular melhor eventos da diferenciação condrogênica devido ao maior centro de hipóxia formado no interior (RANGA *et al.*, 2014). Neste contexto, quando a quantidade de células foi aumentada para 4.000 células/esferoide, foi observado um aumento na média de diâmetro, para 500 μm após 2 semanas de

cultivo, com uma maior intensidade de marcação para componentes tipicamente encontrados na matriz extracelular da cartilagem e quantidade de sGAG total.

Em conclusão, os esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia, apresentaram resultados funcionais que suportam a eficácia do processo de indução, após duas semanas de cultivo e por isso, tornam-se excelentes candidatos para abordagens de reparo ósseo. Em comparação, os esferoides de bmMSCs com um maior número de células, apresentaram uma otimização no processo de diferenciação condrogênica e o esperado é que uma vez no arcabouço, a fase hipertrófica seja também otimizada, quando comparado com os resultados dos esferoides fabricados com a metade do número de células.

8.1.2 Os esferoides de ASCs não apresentam mineralização na matriz extracelular

É sabido a partir da literatura que um dos maiores indícios para comprovar a eficácia da diferenciação osteogênica em modelos *in vitro* é a partir da observação dos depósitos de cálcio, devido ao fato da matriz extracelular óssea ser mineralizada (MURSHED, 2018). A maioria dos trabalhos realiza a comprovação dos depósitos de cálcio e consequentemente, a eficácia da mineralização, pela coloração de Alizarina vermelha (PUCHTLER *et al.*, 1969; MEAD, 2020) e pela coloração de Von Kossa (BILLS *et al.*, 1974; HOLMAR *et al.*, 2020). A partir dessas colorações histológicas, em comparação ao cultivo 2D de monocamada, estudos já relataram que é possível encontrar uma maior quantidade de depósitos de cálcio em cultivos 3D de esferoides (GURUMURTHY *et al.*, 2016).

No entanto, alguns trabalhos já foram publicados afirmando que somente a estratégia por meio dessas colorações não é suficiente para comprovar efetivamente a mineralização óssea madura *in vitro*, como o discutido por BONEWALD e colaboradores (2003) a respeito da coloração de Von Kossa. Dessa maneira, neste presente trabalho, a fim de avaliar a eficácia da mineralização óssea, foram realizadas análises por MET, a fim de ser possível identificar estruturas similares a cristais de hidroxapatita na região central e periférica dos esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia ao longo do período de cultivo. Essa análise foi combinada com EDX para mapeamento dos

elementos fósforo e cálcio, principais constituintes dos cristais de hidroxiapatita, presente na porção mineral do tecido ósseo (NG *et al.*, 1997).

No entanto, essas análises não identificaram estruturas mineralizadas em nenhuma semana de cultivo analisada, mostrando somente uma alta quantidade de fibras de matriz extracelular, possivelmente compostas de colágeno. A ausência de estrutura mineral no presente trabalho pode suportar a hipótese de síntese de uma matriz extracelular hipertrófica e ainda imatura nos esferoides de ASCs induzidos. Além disso, para o nosso conhecimento, nenhum trabalho foi publicado até o momento mostrando a presença de cristalização da matriz extracelular em esferoides individualizados de ASCs induzidos para a via osteogênica. No trabalho desenvolvido por MURAGLIA e colaboradores (2003), os autores identificaram estruturas similares a cristais no interior de esferoides de bmMSCs induzidos para a via de ossificação endocondral após 28 dias de cultivo.

Além disso, neste presente trabalho, a alta expressão do gene ALPL após cinco semanas de cultivo pode estar relacionada a um estágio inicial do processo de mineralização e esse resultado corrobora com a ausência de uma matriz extracelular mineralizada madura no interior dos esferoides de ASCs induzidos. No entanto, esses resultados podem justificar o uso de esferoides de ASCs induzidos para hipertrofia em abordagens *in vivo* de Engenharia de Tecidos de desenvolvimento para etapas iniciais do processo de ossificação endocondral, a fim de induzir a vascularização no local do implante e promover o reparo ósseo.

8.2 O PROCESSO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE MSCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA

8.2.1 Os esferoides de MSCs induzidos para hipertrofia apresentam uma resistência ao processo de fusão

Neste trabalho, foi observado que os esferoides de ASCs induzidos apresentaram uma resistência ao processo de fusão após 2 semanas de cultivo. Essa resistência foi observada a partir da análise de imagens de contraste de fase dos quartetos de esferoides fusionados, da medição do processo de fusão dos dupletos de esferoides fusionados, por imagens de contraste de fase e de

cortes histológicos dos esferoides fusionados (KRONEMBERGER *et al.*, 2021). Além disso, foi observado que esferoides de bmMSCs são capazes de se fundir após 48 h em meio indutor condrogênico.

O processo de fusão de esferoides já é discutido há mais de uma década na literatura, principalmente por ser devido a capacidade de fusão que os esferoides podem ser utilizados como blocos de construção em abordagens de biofabricação. MIRONOV e colaboradores (2009) discutiram a fundo esse conceito e o atribuíram como necessário para alcançar o sucesso nas estratégias de “*bioassembly*” (*do inglês*, auto-montagem) e bioimpressão 3D. No mesmo artigo, os autores apresentaram resultados da biofabricação de uma estrutura vascular, a partir de esferoides bioimpressos fusionados e apontaram a importância da caracterização e medições prévias do processo de fusão de esferoides, justamente para avaliar melhor seu uso em estratégias de biofabricação. A partir dessa descoberta, diferentes outros estudos foram publicados com esse intuito. É importante destacar, que métodos de bioimpressão 3D já foram desenvolvidos com base na propriedade de fusão dos esferoides, como é o caso do método de “Kenzan”, o que reafirma a importância da fusão dos esferoides para a biofabricação de tecidos (AGUILAR *et al.*, 2019).

Neste presente trabalho, os esferoides não induzidos apresentaram um desempenho de fusão ligeiramente melhor do que os esferoides induzidos na segunda semana de indução, corroborando com resultados anteriores da literatura, os quais mostraram que esferoides em um estágio mais maduro de diferenciação exibem uma cinética de fusão mais lenta (OMELIANENKO *et al.*, 2020). Os resultados neste trabalho mostraram que esferoides induzidos apresentaram aproximadamente metade dos valores do ângulo de contato na segunda semana de indução, em comparação com os esferoides não induzidos, revelando um declínio na adesão de fusão. Além disso, o menor diâmetro de contato exibido pelos esferoides induzidos, em comparação com os não induzidos, corrobora com os resultados da medição do ângulo de contato desses esferoides.

As análises morfológicas dos quartetos de esferoides revelaram que os esferoides induzidos permaneceram com limites visíveis entre si após a fusão, a partir de 3 semanas de cultivo. De fato, durante o processo de diferenciação,

MSCs e ASCs criam subpopulações de células no interior dos esferoides, mostrando uma reorganização de sua matriz extracelular (GOUDE *et al.*, 2014; HATA *et al.*, 2017). De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, é possível que alterações na composição da matriz extracelular dos esferoides induzidos causou essa maior resistência ao processo de fusão. Os esferoides induzidos fusionados a partir de três semanas, apresentaram uma alta intensidade de n-caderina e colágeno I. HAJDU e colaboradores (2010) discutiram que um período de incubação mais prolongado para esferoides pode estar associado a um aumento do nível de coesão entre as células, também influenciado pela maior produção de matriz extracelular e maturação mediada por n-caderinas (STEINBERG *et al.*, 1994), bem como por um aumento do acúmulo de fibronectina (ROBINSON *et al.*, 2004) e de proteínas de colágeno (XU *et al.*, 2007), o que corrobora com os nossos resultados. Além disso, no artigo publicado por LEHMAN e colaboradores (2013), os autores mostraram que esferoides de condrócitos em meio indutor cultivados por até três semanas, apresentaram resistência ao processo de fusão e modificações na composição de sua matriz extracelular, o que também corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

SUSIENKA e colaboradores (2016) desenvolveram uma plataforma de alto rendimento para a quantificação da cinética de fusão de esferoides de condrócitos humanos e de células da linhagem tumoral de mama MCF-7. Os autores observaram que para ambos os tipos de células, os valores de medições dos ângulos de contato aumentaram com o tempo de fusão, o que mostra que os esferoides estavam se aproximando. No entanto, no caso dos esferoides de condrócitos humanos, eles apresentaram aumento nos valores de ângulo entre os esferoides, o que mostra uma resistência no final do processo de fusão. De forma similar, neste trabalho, os esferoides induzidos apresentaram um declínio na adesão do processo de fusão a partir da segunda semana, como demonstrado pelas medições de ângulo desses esferoides.

DE MOOR e colaboradores (2020) realizaram a medição da cinética da fusão de esferoides de bmMSCs induzidos para a via condrogênica, a fim de utilizá-los em seguida como blocos de construção na técnica de bioimpressão 3D. Os autores cultivaram os esferoides por 14 dias em meio indutor condrogênico e avaliaram a fusão ao final desse período de cultivo por até 7 dias.

Em 3 dias de fusão, os esferoides já haviam se fusionado completamente em uma única estrutura, o que foi observado a partir de análises de contraste de fase e histológicas. De fato, neste trabalho, os esferoides de ASCs cultivados por duas semanas em meio indutor condrogênico, também se fusionaram completamente em uma única estrutura, como foi possível notar pelas análises histológicas. Além disso, neste trabalho, os esferoides de bmMSCs cultivados por 2 dias em meio indutor, também se fusionaram completamente após 48 h do processo de fusão, como observado pelas análises de contraste de fase e de microscopia de fluorescência.

Como discutido, até o momento, poucos trabalhos avaliaram a cinética de fusão de esferoides e para o nosso conhecimento, nenhum trabalho foi publicado até o momento para avaliar a capacidade de fusão de esferoides cultivados previamente por longos períodos em cultivo, como é o caso deste trabalho, em que a cinética de fusão dos esferoides de ASCs foi avaliada por até cinco semanas. Em resumo, os principais resultados apresentados neste trabalho sugerem que os esferoides de ASCs induzidos apresentam uma maior resistência ao processo de fusão, quando comparado com os não induzidos e que a partir de três semanas de cultivo, os esferoides induzidos de ASCs não foram capazes de se fusionar completamente em uma única estrutura.

No caso dos esferoides de bmMSCs, não foi avaliada a cinética de fusão ao longo de todo o período de cultivo, pois o objetivo foi somente avaliar se esses esferoides seriam capazes de se fusionar posteriormente no arcabouço de PCL, como será discutido em mais detalhes nos tópicos a seguir. Em 48 h de cultivo, foi observado que os esferoides de bmMSCs se fusionaram em uma única estrutura. No entanto, quando cultivados por 7 dias em meio indutor condrogênico, os esferoides de bmMSCs apresentaram claramente uma resistência ao processo de fusão, como observado pelas análises de microscopia por contraste de fase e de fluorescência. Esses resultados corroboram com os discutidos anteriormente, em que um maior período de cultivo em meio indutor pode causar uma resistência ao processo de fusão.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram para uma melhor caracterização do uso de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos para protocolos de biofabricação na área de medicina regenerativa. Além disso, os resultados encontrados com os esferoides de bmMSCs podem contribuir para a

elaboração de protocolos de semeadura desses esferoides em arcabouços poliméricos.

8.2.2 O processo de fusão dos esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia parece otimizar a indução osteogênica *in vitro*

Neste trabalho, foi observado que a fusão dos esferoides de ASCs induzidos para a via hipertrófica pode ter otimizado eventos da diferenciação osteogênica *in vitro*, a partir de análises de imunohistoquímica para marcadores tipicamente encontrados na matriz extracelular óssea, aumento de depósitos de cálcio extracelulares e presença de estruturas similares a cristais no interior dos esferoides.

AHMAD e colaboradores (2018) mostraram uma positividade intensa para proteínas da matriz extracelular óssea, como a osteopontina, em esferoides de ASCs fusionados, além de um aumento nos depósitos de cálcio. De acordo com isso, neste trabalho, o estímulo da fusão em esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia parece estimular um aumento da imunomarcação *in situ* de N-caderina, colágeno I e osteocalcina, preferencialmente no centro dos quartetos de esferoides fusionados. Além disso, os resultados de coloração histológica com Alizarina vermelha também indicam um aumento dos depósitos de cálcio nos quartetos de esferoides fusionados induzidos a partir de três semanas, juntamente com o início da formação de estruturas similares a cristais, revelado por MET.

Dessa maneira, os resultados apresentados neste presente trabalho, sugerem uma melhora da indução osteogênica, devido ao estímulo de fusão de esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia. Essa descoberta pode contribuir para a fabricação de modelos de tecido ósseo *in vitro*, a partir de esferoides de ASCs. No entanto, futuramente, é necessário investigar melhor a relação entre o maior tamanho alcançado pelos esferoides hipertróficos fusionados, quando comparado aos esferoides individualizados e a otimização da diferenciação osteogênica.

8.2.3 A indução da hipertrofia pode influenciar o uso dos esferoides de MSCs como blocos de construção em abordagens de biofabricação

Neste trabalho, os esferoides induzidos de ASCs para a hipertrofia apresentaram propriedades biomecânicas distintas, de modo que foi observado pela primeira vez, uma deformação plástica nesses esferoides no primeiro ciclo de compressão. Após esse ciclo, foi observado que os esferoides induzidos apresentaram um comportamento viscoelástico. No caso, o comportamento plástico observado nas análises biomecânicas desses esferoides pode influenciar seu uso como blocos de construção em abordagens de biofabricação.

Estudos anteriores já afirmaram que abordagens de bioimpressão 3D requerem esferoides com um comportamento viscoelástico (HADJU *et al.*, 2010; Omelyanenko *et al.*, 2020), pois esses serão capazes de manter sua capacidade de fusão, o que irá otimizar a etapa final de maturação do construído. Como já foi discutido anteriormente, a fusão de esferoides é um requisito para o sucesso de abordagens de bioimpressão 3D e *bioassembly* (MIRONOV *et al.*, 2009).

Portanto, para a biofabricação de tecido ósseo a partir de esferoides de ASCs, utilizando o protocolo de indução apresentado neste trabalho, a indução para a via hipertrofia deve ocorrer preferencialmente após o processo de bioimpressão 3D ou até 2 semanas de indução. Em outras palavras, a bioimpressão 3D precisa ser realizada com esferoides na condição não induzida, pois esses esferoides apresentam um comportamento viscoelástico, como observado nos resultados deste trabalho. Esse comportamento manterá a aplicação dos esferoides como blocos de construção, ao permitir o processo de fusão e a indução a diferenciação osteogênica deve ser iniciada, portanto, ao final do processo de bioimpressão 3D e o construído biofabricado irá apresentar um comportamento plástico.

8.3 DESENVOLVIMENTO DE CONSTRUÍDOS *IN VITRO* A PARTIR DA SEMEADURA DE ESFEROIDES DE MSCs EM ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS 3D IMPRESSOS

8.3.1 Os esferoides de MSCs apresentam diferença nos processos de adesão, migração e proliferação celular de acordo com a topografia do arcabouço

Neste trabalho, esferoides de bmMSCs e ASCs foram semeados em arcabouços 3D impressos como abordagem para a área de engenharia óssea. A estratégia de combinar esferoides e biomateriais já foi discutida na literatura, no entanto, poucos trabalhos foram publicados até o momento com esse intuito. Além disso, para o nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que mostra a semeadura de esferoides de ASCs em arcabouços 3D impressos com o objetivo de promover a regeneração de um defeito ósseo crítico em animais. Vale ressaltar, que a tecnologia de manufatura aditiva é considerada inovadora em todo o território nacional.

A revisão de OVSIANIKOV e colaboradores (2018) discutiu as principais vantagens da combinação de esferoides e biomateriais, denominada como estratégia sinérgica das abordagens “*scaffold-based*” (baseadas em arcabouço) e “*scaffold-free*” (livres de arcabouço). Segundo os autores, ao combinar esferoides e biomateriais, é possível alcançar diferentes vantagens que podem contribuir consideravelmente para resolver desafios encontrados na área da Engenharia de Tecidos. Dentre as principais vantagens, é possível destacar: 1) uma elevada densidade celular desde o início do cultivo *in vitro*, 2) excelentes propriedades biomecânicas, 3) a possibilidade de automontagem dos esferoides entre si e dos esferoides com o próprio biomaterial e 4) a capacidade de funcionalização dos construídos com biomoléculas ativas.

Dessa forma, esferoides de ASCs foram inicialmente combinados com arcabouços 3D impressos de PLA/CHA com diferentes tamanhos de poros e geometrias, a fim de selecionar a melhor estrutura topográfica para eventos de adesão, migração e proliferação celular. Foi observado que os arcabouços que apresentaram um maior número de camadas, sendo a última fechada, e um tamanho de poro de 400 µm foram os que promoveram uma maior adesão das

células dos esferoides de ASCs não induzidos, além de uma elevada migração e proliferação em toda a área do arcabouço. Além disso, os esferoides foram capazes de se fundir entre si e em toda a região do biomaterial.

No trabalho desenvolvido por LASCHKE e colaboradores (2013), esferoides de ASCs foram semeados em arcabouços de poliuretano e implantados para avaliar a vascularização *in vivo*. Os autores mostraram que em relação a interação dos esferoides de ASCs com o arcabouço, os esferoides aderiram na superfície do biomaterial e ocuparam os poros de forma homogênea. No entanto, não foi observada migração ou proliferação das células dos esferoides no biomaterial, ao contrário do que foi apresentado nos resultados deste trabalho. Além disso, no artigo publicado por LASCHKE e colaboradores (2013), os esferoides de ASCs não se fundiram entre si ou com o biomaterial, enquanto no presente trabalho, os esferoides de ASCs não induzidos apresentaram uma elevada capacidade de fusão.

AHMAD e colaboradores (2018) semearam esferoides de ASCs em nanofibras de poliácido láctico (PLLA). Os principais resultados mostraram que os esferoides foram capazes de interagir e aderir nas nanofibras de PLLA, além de se fundir no biomaterial, o que otimizou a mineralização dos esferoides. De fato, neste presente trabalho, os esferoides de ASCs apresentaram uma elevada adesão e fusão com o arcabouço de PLA/CHA. Em relação a otimização da mineralização, foi observado neste presente estudo essa otimização em esferoides induzidos para a hipertrofia fusionados, como discutido anteriormente.

No caso dos esferoides de bmMSCs semeados na superfície do arcabouço de PCL, foi observado por microscopia de contraste de fase que os esferoides apresentaram uma elevada capacidade de fusão em toda a área do biomaterial. Em seguida, as análises de colorações histológicas confirmaram que os esferoides foram capazes de povoar toda a área do arcabouço a partir do processo de fusão. No caso dessa estratégia, o interessante a ser destacado é a elevada densidade celular obtida após o período de cultivo e a capacidade do construído de ter se mantido funcional, apesar dessa elevada densidade celular em seu interior. Devido ao fato de esferoides de bmMSCs serem mais explorados na literatura quando comparados aos esferoides de ASCs, um maior

número de trabalhos foi publicado com esse tipo celular para fabricação de esferoides e sua combinação com biomateriais.

SUENAGA e colaboradores (2015) publicaram um dos primeiros estudos mostrando o aumento da eficácia da regeneração óssea com o uso de esferoides de bmMSCs. No trabalho, os autores combinaram os esferoides de bmMSCs com micropartículas de fosfato β -tri cálcico. Os autores observaram após o período de implante que o grupo contendo os esferoides em combinação com as micropartículas, foi o que apresentou uma maior formação de osso novo. No caso, quando comparado com os resultados encontrados neste trabalho, é importante destacar que o arcabouço não é o mesmo, assim como o método de produção. No entanto, é interessante destacar a eficácia de esferoides de bmMSCs em combinação com biomateriais compósitos para a regeneração óssea, o que será discutido em mais detalhes nos tópicos a seguir.

ABBASI e colaboradores (2018), combinaram esferoides de bmMSCs com micropartículas de PDMS para otimizar suas propriedades mecânicas. Os autores observaram que os esferoides de bmMSCs proliferaram quando combinados com o biomaterial e apresentaram alta viabilidade celular. Além disso, os esferoides de bmMSCs mantiveram sua capacidade de diferenciação nas linhagens mesodermas, mesmo com a combinação com os micropartículas. É importante destacar que as células dos esferoides de bmMSCs foram capazes de se proliferar no biomaterial, assim como foi observado neste presente trabalho, que uma vez semeados nos arcabouços 3D impressos de PCL, as células dos esferoides de bmMSCs se proliferaram, além da alta capacidade de fusão dos esferoides.

No trabalho desenvolvido por DALY e KELLY (2019), esferoides de condrócitos e de bmMSCs bioimpressos em arcabouços de PCL apresentaram uma elevada proliferação celular e alta capacidade de fusão. Os resultados mostram que a área do arcabouço de PCL foi preenchida com sucesso pelos esferoides e que eles se mantiveram viáveis e funcionais durante o período de cultivo. No caso, neste trabalho, os esferoides de bmMSCs semeados manualmente no arcabouço de PCL apresentaram um comportamento similar ao encontrado pelos autores, o que corrobora para a eficácia da estratégia para abordagens em Engenharia de Tecidos.

Portanto, a estratégia sinérgica de combinar esferoides com biomateriais, mostrou-se eficiente neste presente trabalho para aplicações em abordagens de Engenharia de Tecidos, tanto utilizando esferoides de ASCs, como de bmMSCs em diferentes tipos de arcabouços poliméricos 3D impressos. Foi observado que os esferoides apresentaram uma elevada capacidade migratória e de fusão, o que aumentou consideravelmente a densidade celular do construído. Devido a essa otimização, será discutido nos tópicos a seguir a vantagem de se utilizar a estratégia apresentada neste trabalho para a regeneração óssea.

8.3.2 Os esferoides de MSCs induzidos a hipertrofia apresentam um comportamento distinto após a semeadura no arcabouço

Os esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia foram semeados no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA e avaliados de acordo com sua capacidade de migração, proliferação e fusão tecidual. No caso dos esferoides de bmMSCs, somente esferoides induzidos foram semeados no arcabouço de PCL.

Inicialmente, foram testados dois tipos de protocolo para a semeadura dos esferoides de ASCs no arcabouço de PLA/CHA. O primeiro protocolo, em que os esferoides estavam em cultivo por duas semanas em meio indutor condrogênico e somente após esse período foram semeados no arcabouço de PLA/CHA, mostrou-se pouco eficiente. Em resumo, os esferoides induzidos apresentaram uma baixa adesão ao biomaterial, o que comprometeu a migração, proliferação e fusão desses esferoides. Esse resultado corrobora com o estudo desenvolvido por ZUBILLAGA e colaboradores (2020), em que esferoides de ASCs pré-induzidos para a via condrogênica, apresentaram uma baixa capacidade de proliferação e fusão no arcabouço de quitosana, apesar da elevada viabilidade celular.

Devido a esse resultado, um novo protocolo foi testado, o qual consistiu na semeadura dos esferoides de ASCs induzidos por até 48 h em meio indutor condrogênico e a semeadura, após esse período, no arcabouço de PLA/CHA por mais duas semanas de indução. Os resultados mostraram um cenário favorável para os esferoides em relação a migração, proliferação e uma elevada densidade celular em toda a área do arcabouço. No caso, os esferoides de bmMSCs também ficaram em cultivo por até 48 h em meio indutor condrogênico e após

esse período que foi feita a semeadura nos arcabouços 3D impressos de PCL. De forma similar, foi observada uma elevada capacidade proliferativa e de fusão desses esferoides. Além do trabalho desenvolvido por DALY e KELLY (2019), nenhum outro trabalho mostrou uma eficácia similar ao se utilizar esse tipo de estratégia de cultivo para esferoides induzidos.

MAIA-PINTO e colaboradores (2020) avaliaram a citotoxicidade de arcabouços de PLA, a partir da semeadura de esferoides de osteoblastos em sua superfície. Foi observado que os esferoides se mantiveram viáveis no período de cultivo *in vitro*, porém os esferoides apresentaram uma baixa capacidade migratória e de proliferação na superfície dos biomateriais. De forma similar, neste presente trabalho, esferoides de ASCs induzidos para a via hipertrófica por duas semanas e em seguida semeados nos arcabouços de PLA/CHA também apresentaram uma baixa adesão e capacidade migratória no biomaterial. No entanto, quando esferoides não induzidos foram semeados no arcabouço de PLA, esses apresentaram elevada capacidade proliferativa e migratória, em toda a área do arcabouço.

O motivo de uma menor eficiência de adesão e fusão no arcabouço de PLA/CHA dos esferoides mantidos por um período mais prolongado em meio indutor, pode ser explicado pelas alterações na matriz extracelular desses esferoides (DE MOOR *et al.*, 2020). O estímulo de fatores de crescimento presente no meio indutor condrogênico pode impactar diretamente as propriedades biomecânicas dos esferoides e aumentar sua resistência ao processo de fusão.

Dessa maneira, os resultados encontrados neste trabalho apontam que para o desenvolvimento de protocolos e abordagens em Engenharia de Tecidos, onde uma elevada densidade celular é desejada, é indicado que esferoides de ASCs ou bmMSCs sejam semeados nos biomateriais após um período curto de manutenção em meio indutor, a fim de não prejudicar, portanto, sua capacidade de adesão e fusão.

8.3.3 Os esferoides de ASCs semeados no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA apresentam elevada secreção de mediadores solúveis

A fim de explorar a funcionalidade dos construídos fabricados a partir da semeadura de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA, foi realizada a quantificação de mediadores solúveis por *MULTIPLEX* após 1 e 2 semanas de cultivo.

Após a análise dos resultados, foi observada uma alta concentração de mediadores relacionados à angiogênese, como VEGF (MELINCOVICI *et al.*, 2018) e IL-8 (HOU *et al.*, 2014) e à osteogênese, como o RANTES (CÓRDOVA *et al.*, 2017) após 1 semana de cultivo e por ambos os grupos. Além desses mediadores, também foi observada uma alta secreção de IFN γ , diretamente relacionado ao controle do metabolismo ósseo (TANG *et al.*, 2018) e de IL-1 α , o receptor antagonista da citocina pró-inflamatória IL-1 (SCHIFF, 2000; HU *et al.*, 2015).

Quando comparado a secreção de mediadores solúveis pelos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia individualizados, foi observado um maior número de mediadores secretados e uma maior concentração em pg/mL nos grupos de construídos, onde esses esferoides foram semeados no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA. Tal resultado pode ser explicado por uma maior funcionalidade dos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos após seu contato com o arcabouço de PLA/CHA. De fato, diferentes estudos já foram publicados mostrando que biomateriais elevam a capacidade funcional de MSCs *in vitro* (WU *et al.*, 2019; AGRAWAL *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2019; ROSTAMI *et al.*, 2020).

O VEGF é o fator de crescimento principal no desenvolvimento de vasos sanguíneos e por isso, torna-se essencial para os processos de ossificação ocorrerem adequadamente (DAI e RABIE, 2007). Em ambos os grupos de construídos, o VEGF mostrou uma concentração elevada no período de 1 e 2 semanas de cultivo, o que mostrou uma alta funcionalidade de ambos para o momento do implante em defeito ósseo crítico. A elevada secreção de VEGF pelos construídos pode, portanto, ter relação positiva com a formação de tecido ósseo novo e de vasos sanguíneos no local do defeito. O IL-8 também apresenta um papel para o desencadeamento do processo de angiogênese (DARVISHI *et*

al., 2019). Essa citocina também se mostrou elevada em ambos os grupos de construídos, porém em uma concentração inferior ao VEGF, principalmente após 1 semana de cultivo. Mesmo com a redução após 2 semanas de cultivo, a concentração de IL-8 nos construídos foi ainda superior à observada nos esferoides individualizados de ambos os grupos experimentais no mesmo período.

O IL-6 é classicamente descrita como uma citocina pró-inflamatória, porém foi descrita recentemente como responsável também por mediar as funções de osteoblastos e osteócitos (WANG e HE, 2020). Essa citocina mostrou-se elevada em ambos os grupos na primeira semana de cultivo, ao passo que mostrou uma redução após 2 semanas. O mesmo comportamento de secreção foi observado com o IFN γ , sendo conhecido na literatura por suprimir a reabsorção do tecido ósseo em condições patológicas (TAKAYANAGI *et al.*, 2005; KATO *et al.*, 2020), e com a o IL-1ra, que por ser o receptor antagonista do IL-1, bloqueia suas propriedades pró-inflamatórias em condições patológicas, como a osteoartrite (SCHIFF, 2000). De fato, no estudo desenvolvido por HU e colaboradores (2015), quando MSCs foram transfectadas com o gene de IL-1ra, houve uma redução na fibrose em grupos de ratos induzidos para a osteoartrite. A alta concentração desses mediadores pode apresentar uma resposta positiva para estimular o crescimento ósseo no local do defeito e bloquear respostas inflamatórias exacerbadas. Os níveis de RANTES foram mais elevados no grupo de esferoides de ASCs não induzidos semeados no arcabouço de PLA/CHA após 1 semana de cultivo. Como essa quimiocina induz o processo de osteogênese em MSCs (LIU *et al.*, 2014), esse grupo pode ter apresentado uma maior funcionalidade para essa via de diferenciação após o contato com o arcabouço de PLA/CHA.

Dessa maneira, a partir dos resultados encontrados, foi possível observar que uma vez semeados no arcabouço 3D impresso de PLA/CHA, os esferoides não induzidos e induzidos a hipertrofia apresentaram uma alta funcionalidade e que a alta secreção de mediadores solúveis relacionados à angiogênese e osteogênese podem ter um impacto positivo no processo de regeneração em defeito ósseo crítico.

8.3.4 O uso do bioreator pode influenciar positivamente na manutenção do cultivo dos construídos

O uso de biorreatores para o cultivo de células começou a ser ativamente explorado na década de 80, onde os primeiros biorreatores para cultivo de células de mamíferos foram desenvolvidos (TRAMPLER E VLAK, 1988). Ao passar dos anos, com o avanço das abordagens de medicina regenerativa, os estudos aumentaram significativamente, de forma que atualmente a busca com a palavra-chave “*bioreactor*” (do inglês, biorreator) na base de dados “Pubmed” retorna um total de 49.691 artigos (busca feita em 28/04/2021 às 10h:06min).

O principal motivo para esse impacto na literatura é porque o cultivo dinâmico a partir de biorreatores permite uma melhor recapitulação *in vitro* da fisiologia, por promover um melhor transporte de gases, nutrientes e resíduos metabólicos, o que mantém a viabilidade celular em construídos de maior densidade. Além disso, cultivos estáticos não representam fidedignamente o microambiente nativo da maioria dos tecidos (RAVICHANDRAN *et al.*, 2017). Uma outra vantagem diretamente relacionada ao uso dos biorreatores é a otimização das propriedades biomecânicas dos construídos (HANSMANN *et al.*, 2013). Diferentes tipos de biorreatores estão disponíveis para uso em cultivo celular, como por exemplo: os baseados em frascos giratórios, os frascos de paredes rotativas, em sistemas de perfusão e reatores de fluxo pulsáteis (CHEN *et al.*, 2008).

No caso de aplicação para o tecido ósseo, quando células ósseas são colocadas para proliferar *in vitro*, há a produção de uma matriz extracelular mais rígida e mais macia. No entanto, com a aplicação de forças mecânicas, a produção de matriz extracelular pode ser consideravelmente aumentada e estabelecida em um local mais bem definido, onde o estímulo estará sendo direcionado. Em consequência, o aumento da produção de matriz extracelular normalmente oferece resultados mais positivos em relação a funcionalidade do construído (HAJ *et al.*, 2010; NOKHBATOLFOGHAEI *et al.*, 2017). Desse modo, muitos biorreatores são projetados para aumentar o estímulo da força mecânica, seja aplicando as forças diretamente na célula ou pela transferência de força a partir dos arcabouços, que contém as células semeadas (CARTMELL *et al.*, 2016).

Neste presente trabalho, esferoides de bmMSCs semeados no arcabouço de PCL foram mantidos em sistema dinâmico de biorreator por um período de três semanas. O tipo de biorreator utilizado neste trabalho realizava uma força de compressão, justamente para estimular um melhor comportamento biomecânico e uma otimização do processo de diferenciação. Além disso, o movimento compressivo constante do biorreator, permitiu uma melhor troca dos fatores de crescimento do meio de cultivo no interior dos construídos.

O uso de biorreatores para estimular forças compressivas já é largamente explorado pela literatura e diferentes estudos ao longo dos anos já mostraram suas vantagens para abordagens em engenharia óssea ou de cartilagem (LIU *et al.*, 2011; MATZIOLLIS *et al.*, 2011; MICHALOPOULOS *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2014; HOFFMAN *et al.*, 2015). O que todos esses estudos apresentaram em comum é que em todos os resultados houve um aumento na produção de matriz extracelular e uma distribuição mais homogênea das células nos construídos. Em adição, nos estudos desenvolvidos por MATZIOLLIS e colaboradores (2011), LIU e colaboradores (2011) e MICHALOPOULOS e colaboradores (2012), houve uma maior expressão de genes envolvidos diretamente com a via de diferenciação osteogênica, como por exemplo, de osteopontina e de ALPL. De forma similar, neste presente trabalho, foi observado uma alta densidade de matriz extracelular a partir dos cortes histológicos dos construídos mantidos em sistema de biorreator. Além disso, a matriz extracelular produzida foi funcional para componentes tipicamente encontrados na cartilagem e apresentou marcação positiva para cálcio extracelular. No entanto, neste presente trabalho, não foi avaliada a expressão de genes relacionados a via de diferenciação condrogênica ou osteogênica, pois o objetivo era avaliar modificações somente na matriz extracelular dos construídos.

Em relação a abordagens baseadas em esferoides, como foi realizado neste presente trabalho, MIRONOV e colaboradores (2011) já discutiram a importância do uso de biorreatores para construídos biofabricados a partir desse tipo de cultivo 3D. Os autores defenderam o uso dos biorreatores após o processo de bioimpressão 3D dos esferoides, a fim de realizar a maturação dos construídos. Além disso, o uso dos biorreatores permite que muitos esferoides se fusionem de forma eficiente sem ocorrer prejuízo da viabilidade celular e de suas propriedades funcionais. De fato, TANIGUCHI e colaboradores (2018)

confirmaram que o uso de biorreatores para a maturação de esferoides foi necessário em um modelo de traqueia bioimpresso.

O número de estudos na literatura em que foi realizado o cultivo de esferoides em biorreatores é ainda considerado limitado. Um dos artigos iniciais, utilizou agregados de células embrionárias do membro de camundongos para promover a diferenciação condrogênica em cultivo de biorreator. Em seguida, os agregados foram implantados em defeito ósseo crítico de calvária de ratos para avaliar a regeneração óssea (MONTUFAR-SOLIS *et al.*, 2004). No entanto, a maioria dos trabalhos publicados atualmente foi feita utilizando os biorreatores para promover a formação de esferoides (ZHANG *et al.*, 2015; YAN *et al.*, 2018), com esferoides cultivados em biorreatores para a fabricação de modelos teciduais hepáticos de maior funcionalidade (BHISE *et al.*, 2016; AHMED *et al.*, 2017; SHARIF *et al.*, 2019) e para o desenvolvimento de modelos tumorais mais complexos (MASSAI *et al.*, 2016; ROGERS *et al.*, 2018).

Até o momento, somente DALY E KELLY (2019) realizaram o cultivo de esferoides semeados em arcabouços de PCL em sistema dinâmico de biorreator. No entanto, o objetivo final não era promover a formação óssea *in vivo*. Dessa forma, frente ao baixo número de estudos encontrado na literatura, a estratégia desenvolvida neste presente trabalho é considerada inovadora para a área de Engenharia de Tecidos e pode ser considerada promissora para promover a regeneração de lesões ósseas críticas.

8.4 FABRICAÇÃO DE ESFEROIDES VASCULARES PARA ENGENHARIA ÓSSEA

8.4.1 O uso da biotinta de fibrina impacta positivamente no cultivo de esferoides vasculares

Neste presente trabalho, foram fabricados esferoides vasculares de co-cultivo de bmMSCs:HUVECs como uma abordagem para pré-vascularização de construídos para Engenharia de Tecidos. Esses esferoides vasculares foram semeados em biotinta de fibrina para a otimização da produção de microvasos *in vitro* e como uma nova estratégia para o desenvolvimento de construídos mais complexos para engenharia óssea.

Diferentes trabalhos já foram publicados no decorrer dos anos para a fabricação de esferoides vasculares a partir de co-cultivo. A vantagem de se trabalhar com os esferoides para co-cultivo de componentes vasculares é a maior densidade de células obtidas prontamente e uma melhor organização das células no interior dos esferoides (BURDIS e KELLY, 2020; DALTON *et al.*, 2020). Na maioria desses estudos, a fonte de célula endotelial mais utilizada é a HUVEC, a qual também foi selecionada para esse presente trabalho. As HUVECs são largamente utilizadas desde a década de 80 (SPRANDIO *et al.*, 1988; RAO *et al.*, 1988) e são consideradas o tipo de célula endotelial mais popular, provavelmente porque veias umbilicais humanas são relativamente mais disponíveis do que outros tipos de vasos sanguíneos (CAO *et al.*, 2017). No caso do outro componente celular, os estudos são variados, de acordo com a aplicação final, mas já foram utilizadas iPSCs (ASAI *et al.*, 2017; KEHTARI *et al.*, 2018), ASCs (VERSEIJDEN *et al.*, 2010; DE MOOR *et al.*, 2018), células de linhagem tumoral (SCHERZED *et al.*, 2016) e bmMSCs (ROUWKEMA *et al.*, 2006; HEO *et al.*, 2019; BENMERIDJA *et al.*, 2020).

Um dos primeiros desafios no momento da fabricação de esferoides de co-cultivo é a etapa de padronização da concentração de células a ser utilizada de cada tipo celular. Por conta disso, neste trabalho, foram inicialmente testadas diferentes proporções de bmMSCs e HUVECs. A maioria dos estudos publicados já mostrou que uma maior concentração de MSCs favorece a formação dos esferoides de co-cultivo, pois essas células promovem uma melhor estabilidade das células endoteliais por ação parácrina e, por isso, os esferoides se mantêm viáveis e funcionais por períodos mais prolongados de cultivo (VERSEIJDEN *et al.*, 2010). De fato, neste trabalho, foi observado que os esferoides de co-cultivo fabricados na proporção de 3bmMSCs:1HUVEC foram os que apresentaram as melhores respostas morfológicas e funcionais. No artigo publicado por ZHANG e colaboradores (2014), os esferoides de co-cultivo de bmMSCs e HUVECs também foram feitos na proporção 3:1, respectivamente, e os resultados mostraram que nessa proporção, os esferoides foram homogêneos em tamanho e forma, além de apresentarem intensa marcação para CD31. HEO e colaboradores (2019), utilizaram essa mesma proporção para fabricação dos esferoides de co-cultivo entre bmMSCs:HUVECs e os esferoides apresentaram alta taxa proliferativa, alta viabilidade celular e marcação positiva para CD31.

Neste presente trabalho, os esferoides de co-cultivo na proporção de 3bmMSCs:1HUVEC foram os que apresentaram a produção mais evidente de microvasos *in vitro*. A maioria dos trabalhos publicados com esferoides vasculares de co-cultivo avaliam sua funcionalidade a partir da marcação *in situ* de CD31 (ROUWKEMA *et al.*, 2006; VERSEIJDEN *et al.*, 2010; DISSANAYAKA *et al.*, 2014; DE MOOR *et al.*, 2018; HEO *et al.*, 2019; BENMERIDJA *et al.*, 2020). No entanto, neste trabalho, foram utilizadas HUVECs transfectadas com GFP e por isso, foi possível avaliar a formação de microvasos dos esferoides a partir do processo de *sprouting*, diretamente por microscopia de fluorescência. O artigo publicado por SHAH e colaboradores (2019) discute diferentes tipos de protocolos para fabricação de esferoides vasculares de co-cultivo e seus principais resultados. Dentre eles, os autores apresentaram imagens de microscopia de fluorescência onde foi possível observar a formação de microvasos por *sprouting* de esferoides formados a partir do co-cultivo de células endoteliais humanas e MSCs, em corroboração com os nossos resultados. No entanto, neste presente trabalho, foi observada uma formação mais eficiente da rede de microvasos por *sprouting* dos esferoides de bmMSCs:HUVECs.

Neste estudo, a fibrina foi selecionada como hidrogel/biotinta para o ensaio de *sprouting* dos esferoides vasculares fabricados em diferentes proporções e nas etapas posteriores do trabalho. A fibrina é um biomaterial natural formado durante a coagulação sanguínea e exerce um papel fundamental *in vivo* em processos de injúria tecidual (DE MELLO *et al.*, 2020). A organização desse biopolímero consiste em uma elevada quantidade de fibras randomizadas dispostas em uma rede, formada a partir da reticulação do fibrinogênio com a enzima trombina (LI *et al.*, 2015). Devido a sua fácil metodologia de preparo, manipulação, biocompatibilidade e biodegradabilidade, a fibrina é largamente utilizada em abordagens de Engenharia de Tecidos (PARK e WOO, 2018). Além disso, a fibrina apresenta excelentes propriedades biomecânicas, o que é difícil de alcançar em biomateriais baseados em hidrogéis e pode ser facilmente funcionalizada, como a partir da mistura com gelatina para fabricar uma estrutura de arcabouço 3D (DE MELLO *et al.*, 2020).

O motivo da fibrina ter sido selecionada para este presente trabalho também é devido ao seu sucesso em aplicações para a fabricação de estruturas vasculares (APER *et al.*, 2016; TAKEHARA *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2020) e

para estratégias de engenharia óssea (NOORI *et al.*, 2017; BLINSTEIN *et al.*, 2018; AHN *et al.*, 2019). Além disso, NULTY e colaboradores (2021) já haviam mostrado seu potencial para as estratégias de co-cultivo e para abordagens de bioimpressão 3D, como será discutido em detalhes nos tópicos seguintes.

Em relação a trabalhos publicados com esferoides vasculares de co-cultivo, os artigos utilizam hidrogéis para promover a formação de esferoides de co-cultivo ou para avaliar a funcionalidade dos esferoides de co-cultivo fabricados, principalmente em relação a formação de microvasos *in vitro* por *sprouting*. VERSEIJDEN e colaboradores (2011) também utilizaram a fibrina, porém para cultivar esferoides formados a partir de ASCs e HUVECs ou a partir de bmMSCs e HUVECs. Além da marcação positiva para CD31 dos esferoides, a partir das análises histológicas, os autores mostraram por imagens de contraste de fase, que quando cultivados na fibrina, os esferoides formavam uma rede interconectada, similar a estruturas tubulares. De fato, neste presente trabalho, foram observadas as mesmas estruturas por imagens de contraste de fase, inclusive quando os esferoides de co-cultivo foram semeados nos canais vasculares 3D impressos. No entanto, somente esse indicativo não é suficiente para comprovar a funcionalidade dos esferoides de co-cultivo e a formação de microvasos *in vitro*, justamente porque a formação dessas estruturas pode ser somente uma resposta migratória das próprias células em contato com o hidrogel. Por esse motivo que neste trabalho foram realizadas as análises de microscopia de fluorescência, a fim de ser possível comprovar que as estruturas eram similares a eventos de *sprouting* e provenientes das HUVECs, visto que essas células eram transfectadas com GFP.

De forma similar, DE MOOR e colaboradores (2018) observaram as mesmas estruturas por contraste de fase quando esferoides de co-cultivo de ASCs e HUVECs foram semeados em Matrigel®. Neste caso, não foi utilizada a fibrina, porém os esferoides apresentaram marcação positiva de CD31 e a mesma formação de estruturas por contraste de fase. Esse resultado pode ser um outro indício de a formação dessas estruturas ser uma resposta migratória das células em hidrogel.

HEO e colaboradores (2019) produziram esferoides de co-cultivo de bmMSCs e HUVECs e semearam esses esferoides em hidrogel de fibrina e colágeno. Esse artigo corrobora com a discussão na literatura sobre a facilidade

de funcionalizar a fibrina para cultivo celular. Os resultados desse trabalho mostraram que os esferoides vasculares eram funcionais e houve a formação de estruturas similares ao encontrado em nosso trabalho e em artigos anteriores.

Um detalhe interessante observado a partir dos resultados encontrados é que a metodologia de cultivo das MSCs em expansão em monocamada, pode influenciar diretamente na qualidade dos esferoides de co-cultivo. De fato, neste trabalho, foi observado que quando cultivadas em um ambiente de normóxia, as bmMSCs não produziram, posteriormente, esferoides vasculares funcionais. Em corroboração, PECK e colaboradores (2019) mostrou que o cultivo em hipóxia de bmMSCs impacta diretamente em sua proliferação e em suas propriedades funcionais.

Em conclusão, os esferoides vasculares produzidos neste trabalho, a partir do co-cultivo de bmMSCs e HUVECs, apresentaram homogeneidade de tamanho e forma, além de melhores propriedades funcionais, quando fabricados em uma maior concentração de bmMSCs. Esses esferoides produziram microvasos *in vitro* e apresentam, portanto, potencial para aplicações em abordagens de Engenharia de Tecidos, tanto para a biofabricação de modelos vasculares, como para modelos de tecido ósseo de maior complexidade.

8.4.2 A densidade de esferoides vasculares semeados em biotinta de fibrina influencia suas propriedades funcionais

Neste presente trabalho, esferoides vasculares de co-cultivo na proporção de 3bmMSCs:1HUVECs foram semeados em diferentes densidades (baixa, média e alta) na biotinta de fibrina, a fim de avaliar sua funcionalidade. O motivo principal dessa investigação foi para etapas posteriores do projeto, em que os esferoides foram semeados no canal central do arcabouço de PCL em biotinta de fibrina. Dessa forma, foi necessário investigar a quantidade ótima de esferoides vasculares na fibrina para que não houvesse prejuízo na formação de microvasos por *sprouting*.

Dentre os resultados obtidos, foi observado por microscopia de fluorescência que em uma maior densidade de esferoides, a formação de microvasos *in vitro* é mais eficiente. Essa é a primeira vez que foram mostrados

resultados desse tipo de investigação, com os esferoides vasculares fabricados a partir de co-cultivo. No artigo de NASHIMOTO e colaboradores (2017), os autores semearam esferoides em um sistema de microfluidica e combinaram esses esferoides com uma alta quantidade de HUVECs em proximidade com os esferoides. No caso desse artigo, não foram produzidos esferoides de co-cultivo, mas os autores sinalizaram que uma quantidade alta de HUVECs em proximidade com os esferoides, favoreceu a formação de microvasos *in vitro*.

No artigo publicado por HEO e colaboradores (2019), os autores semearam uma elevada quantidade de esferoides de co-cultivo de bmMSCs:HUVECs em hidrogel de fibrina/colágeno. O objetivo do trabalho não era investigar o impacto da quantidade de esferoides em sua funcionalidade. Os resultados mostraram que os esferoides vasculares foram funcionais, com marcação positiva para CD31. Porém, foi observado que os esferoides não se fusionaram entre si, por mais que estivessem em proximidade. Em corroboração, neste presente trabalho, os esferoides vasculares de co-cultivo não foram capazes de se fundir. Além disso, o resultado das análises histológicas apresentadas por HEO e colaboradores (2019) foram similares ao encontrado neste presente trabalho, para esferoides semeados em uma média e em uma alta densidade.

No entanto, KIM e colaboradores (2019) observaram que esferoides de co-cultivo de ASCs e de *human turbinate* MSCs (hTMSCs, *do inglês*, células-tronco mesenquimais da cavidade nasal) com HUVECs foram capazes de se fundir entre si em uma estrutura mais complexa, o que os torna excelentes candidatos para serem usados como blocos de construção em abordagens de bioimpressão 3D. Não houve nenhuma avaliação relacionada a densidade dos esferoides e a funcionalização foi definida pela marcação positiva de VE-Caderina e pela formação de estruturas similares a tubos por contraste de fase.

Portanto, neste trabalho, foi observado pela primeira vez o impacto da densidade dos esferoides vasculares de co-cultivo em sua funcionalidade, o que pode contribuir positivamente para estudos futuros na área. Em relação as propriedades de fusão, para o objetivo principal desse estudo, o esperado era que os esferoides de co-cultivo fossem capazes de produzir microvasos *in vitro*, o que foi alcançado. Porém, é interessante desenvolver estudos no futuro para investigar em mais detalhes a capacidade de fusão desses esferoides. Para o

modelo desenvolvido nesse trabalho, os esferoides vasculares de co-cultivo foram semeados no canal central do arcabouço de PCL como uma estratégia de pré-vascularização, como será discutido a seguir, e por isso que o interessante foi avaliar sua capacidade de formação de microvasos *in vitro* em diferentes densidades.

8.5 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS PRÉ-VASCULARIZADOS *IN VITRO*

8.5.1 A pré-vascularização dos construídos com esferoides vasculares não impacta a manutenção do cultivo *in vitro*

Neste presente trabalho, foi desenvolvida uma estratégia de pré-vascularização baseada em esferoides vasculares de co-cultivo semeados em um canal central do arcabouço de PCL 3D impresso. Além do canal central preenchido por esferoides vasculares, o arcabouço continha esferoides induzidos para a hipertrofia fusionados em toda a sua região periférica. Esse construído foi desenvolvido como uma estratégia para aplicação em defeitos ósseos críticos, principalmente com o objetivo de otimizar a vascularização no local do defeito, um dos principais desafios na área de Engenharia de Tecidos.

Na última semana de cultivo *in vitro*, os construídos foram mantidos em meio de crescimento endotelial com a adição de VEGF, sem nenhum fator de indução a hipertrofia. Foi observado que não houve indício de morte celular, alteração no processo de fusão e redução da produção de matriz extracelular pelos esferoides presentes na região periférica do arcabouço. De fato, FURUMATSU e colaboradores (2003) já haviam apresentado resultados mostrando a necessidade do VEGF para a formação óssea e como esse fator de crescimento induz a osteogênese *in vitro*. Esse resultado mostra, portanto, que a presença dos esferoides vasculares no canal central e a manutenção em meio de crescimento endotelial não impactou na manutenção do construído.

A pré-vascularização de construídos já é largamente discutida na literatura como uma etapa essencial para o reparo funcional de lesões ósseas críticas, pois já foi mostrado que a falta de vascularização no local do implante é um dos principais motivos para a inibição do processo de regeneração óssea (BREENAN *et al.*, 2013). Dentre os artigos publicados com estratégias de pré-

vascularização até o momento, esse é o primeiro trabalho que mostra esse tipo de modelo tecidual, baseado totalmente em esferoides hipertróficos e vasculares de co-cultivo semeados em um arcabouço 3D impresso. A maioria dos artigos até o momento foi realizada com construídos fabricados a partir de arcabouços com células em suspensão, os quais apresentaram resultados positivos de pré-vascularização *in vitro* e/ou *in vivo* (PAGLIARI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015; KLOTZ *et al.*, 2018; YAO *et al.*, 2020; VIDAL *et al.*, 2020). No entanto, no trabalho de FREEMAN e colaboradores (2015), foram utilizados agregados de bmMSCs e uma suspensão celular de HUVECs.

FREEMAN e colaboradores (2015) desenvolveram uma estratégia de pré-vascularização para tecido ósseo, baseada no processo de ossificação endocondral. Nesse artigo, agregados de bmMSCs induzidos para a via condrogênica com uma suspensão de HUVECs foram semeados em arcabouços porosos de PCL. No caso, foi utilizado alginato para a semeadura dos componentes celulares no arcabouço, ao contrário deste trabalho, em que foi utilizada a fibrina. Os resultados mostraram que quando implantados em defeito subcutâneo, os construídos pré-vascularizados foram os que apresentaram formação de mineralização e de vasos sanguíneos. Por microscopia de fluorescência, os autores mostraram que os construídos apresentaram uma elevada densidade de células, corroborando com os resultados encontrados neste presente trabalho.

ZHANG e colaboradores (2015) desenvolveram um construído em que HUVECs foram semeadas em um arcabouço poroso de seda como uma estratégia de pré-vascularização *in vitro*. O objetivo era que as HUVECs infiltrassem o interior do arcabouço para a produção de redes vasculares *in vivo* e de fato, o grupo implantado com os arcabouços contendo as HUVECs em defeito subcutâneo, foi o que apresentou uma marcação mais intensa para CD31 e uma maior formação de vasos sanguíneos. No entanto, em relação a densidade do construído, não foi observada uma densidade celular muito elevada, como apresentado neste presente trabalho.

KLOTZ e colaboradores (2018) fabricaram um construído a partir de MSCs e células endoteliais semeadas em um hidrogel de gelatina metacrilada como estratégia de pré-vascularização para engenharia óssea. No caso, as células endoteliais foram posicionadas na região central do hidrogel e as MSCs

na região periférica. Os principais resultados mostraram que os construídos apresentaram uma alta densidade celular, produção de depósitos de cálcio e a formação de microvasos *in vitro* em toda a sua área, o que representa uma infiltração eficiente dos microvasos. Neste presente trabalho, também foi observada a formação de depósitos de cálcio *in vitro* e os construídos também apresentaram uma alta densidade celular.

XU e colaboradores (2019) fabricaram camadas de células pré-vascularizadas contendo células endoteliais derivadas da medula óssea e bmMSCs induzidas para a via osteogênica, como uma estratégia livre de arcabouços para a regeneração de defeitos ósseos críticos. Nos resultados, os autores mostraram a nova formação de tecido ósseo e de uma vascularização mais madura nesse grupo *in vivo*, quando comparado ao controle. No entanto, a análise macroscópica dos grupos pré-vascularizados mostrou uma baixa quantidade de tecido formado, ao contrário do que foi observado nos construídos deste presente trabalho, após o implante subcutâneo em camundongos.

YAO e colaboradores (2020) desenvolveram um arcabouço de PCL com poros hexagonais para guiar o crescimento e a proliferação de células endoteliais. Essa estratégia foi realizada com o objetivo de otimizar o processo de angiogênese e pode ser considerada como uma estratégia de pré-vascularização. Os resultados mostraram que a porosidade do arcabouço foi capaz de guiar melhor o crescimento das HUVECs e a formação da rede vascular *in vitro*. Em relação a densidade celular, não foi observada uma alta densidade de células, ao contrário do que foi observado nos construídos desenvolvidos neste presente trabalho.

VIDAL e colaboradores (2020) realizaram uma estratégia de pré-vascularização baseada na impressão 3D de biomateriais compósitos perfundidos com uma rede vascular local e com a adição da fração estromal vascular do tecido adiposo. O grupo pré-vascularizado foi implantado em modelo de defeito ósseo crítico, onde foi observada a formação de novos vasos sanguíneos e de tecido ósseo novo. Os arcabouços apresentaram uma elevada densidade de tecido novo e uma alta densidade de células, como foi observado nos construídos pré-vascularizados neste presente trabalho, *in vitro* e *in vivo*.

Portanto, a partir da discussão dos artigos publicados anteriormente, é possível observar que a abordagem de pré-vascularização desenvolvida neste

presente trabalho é considerada inovadora na área e apresenta elevado potencial para otimizar a regeneração óssea e a vascularização no local da lesão, principalmente pela funcionalidade dos esferoides vasculares e do construído, após o período de indução em sistema dinâmico de biorreator. Além disso, uma alta densidade de células foi observada no construído *in vitro*, assim como a formação de tecido novo após o período de implante subcutâneo em camundongos.

8.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

8.6.1 Os construídos com esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia formam tecido ósseo novo em modelo de defeito crítico

Neste presente trabalho, esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia foram semeados pela primeira vez em arcabouços 3D impressos de PLA/CHA como uma estratégia para regeneração em defeito ósseo crítico de calvária em ratos. Esse grupo foi comparado com o grupo PLA/CHA sem esferoides semeados e nos mesmos períodos experimentais. A partir dos resultados, foi observado que o grupo contendo os esferoides induzidos a hipertrofia foram os que mostraram uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado.

Como discutido anteriormente, a estratégia sinérgica de combinar esferoides com arcabouços 3D promete solucionar diferentes desafios encontrados na área de Engenharia de Tecidos (OVSIANIKOV *et al.*, 2018). No entanto, até o momento, poucos estudos foram publicados com essa abordagem. No caso, o uso de arcabouços biomiméticos já era largamente explorado na literatura e o fato deles serem bioativos, otimiza o processo de diferenciação no tecido desejado e, conseqüentemente, a regeneração *in vivo* (ZHU *et al.*, 2016). Nesse contexto, um detalhe interessante a ser destacado neste presente trabalho é que o arcabouço de PLA foi funcionalizado com hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada (CHA) (PALHARES *et al.*, 2021) e o arcabouço de PCL com um *coating* (do inglês, cobertura) de nano hidroxiapatita

(nHP), a fim de aprimorar os biomateriais poliméricos e torná-los mais osteocondutores.

A hidroxiapatita é o principal componente da porção mineral do tecido ósseo (BUCKWALTER *et al.*, 1995). A CHA já se mostrou eficiente para a fabricação de substitutos ósseos (LIAO *et al.*, 2005; LIAO *et al.*, 2007; CALASANS-MAIA *et al.*, 2015; RESENDE *et al.*, 2019), assim como o *coating* de nHP em arcabouços poliméricos. O tipo de *coating* utilizado neste presente trabalho, baseado em agulhas de nHP, já apresentou elevado potencial para regeneração óssea *in vivo*, provavelmente por representar uma melhor área de contato para interação dos osteoblastos (EICHHOLZ *et al.*, 2020).

Como mencionado, o número de artigos que utilizaram esferoides em estratégias baseadas em arcabouços ainda é baixo, pois o maior número de artigos publicados ainda utiliza somente esferoides com fatores de crescimento para investigar a regeneração de defeitos críticos (MORITANI *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020; FINDEISEN *et al.*, 2021; DI STEFANO *et al.*, 2021). Porém, os resultados apresentados até o momento com a abordagem sinérgica de combinar esferoides e arcabouços são considerados promissores para a área de engenharia óssea. LASCKE e colaboradores (2014) avaliaram a capacidade de vascularização *in vivo* de esferoides de ASCs induzidos para a via osteogênica semeados em arcabouço de poliuretano, quando combinado com esferoides não induzidos. Os autores observaram que os esferoides induzidos semeados no arcabouço apresentaram uma eficiência menor na formação de novos vasos sanguíneos *in vivo*, quando comparado aos não induzidos. Neste presente trabalho, esferoides de ASCs também foram utilizados, porém semeados em outro arcabouço polimérico e em um modelo de defeito ósseo crítico. No entanto, também foi observado a presença de vasos sanguíneos no grupo contendo os esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia em combinação com o biomaterial no local do defeito.

ROUX e colaboradores (2018) desenvolveram esferoides de co-cultivo de bmMSCs e HUVECs encapsulados em biotinta de fibrina, a fim de avaliar *in vivo* seu impacto na regeneração óssea. Em cultivo *in vitro*, os construídos já foram capazes de formar redes vasculares. Após o período de implante em modelo de calvária em ratos, os autores mostraram que houve uma elevada intensidade de marcação de CD31 e que essa estratégia otimizou a vascularização no local do

defeito, assim como a formação inicial de tecido ósseo. Neste presente trabalho, não foi utilizado o mesmo construído para implante em defeito ósseo crítico em ratos, porém, também foi observado osso neoformado nos grupos contendo esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados em PLA/CHA, assim como a presença de novos vasos sanguíneos no local do defeito. No caso, é importante destacar que após 1 mês de implante, somente o construído contendo esferoides de ASC induzidos a hipertrofia apresentaram osso neoformado na região central do defeito.

LEE e colaboradores (2020) desenvolveram uma microcâmara de PCL para a entrega de esferoides de ASCs em defeito ósseo crítico de calvária em ratos. As microcâmaras apresentaram um revestimento de PDGF e BMP-2. Os esferoides foram formados nas próprias microcâmaras, induzidos para a via osteogênica e apresentaram alta viabilidade *in vitro*. Após o implante *in vivo*, os autores observaram uma formação significativa de osso novo, quando comparado com o grupo coágulo. Neste presente trabalho, o grupo contendo esferoides de ASC não induzidos semeados em arcabouço de PLA/CHA apresentaram menor quantidade de tecido ósseo neoformado ao longo dos períodos experimentais, quando comparado ao grupo de esferoides de ASC induzidos a hipertrofia semeados no arcabouço de PLA/CHA. No caso, também é importante destacar que o tipo de biomaterial era diferente, quando comparado ao trabalho de LEE e colaboradores (2020) e estes autores não exploraram o potencial de esferoides induzidos a hipertrofia para a regeneração óssea.

NULTY e colaboradores (2021), desenvolveram um construído contendo esferoides induzidos a hipertrofia e avaliaram seu potencial para formação de tecido ósseo novo em modelo de defeito subcutâneo. Os autores mostraram que o grupo contendo os esferoides induzidos a hipertrofia produz maior quantidade de osso novo, quando comparado ao grupo controle do estudo. De forma similar, também foi observado neste estudo que os esferoides induzidos a hipertrofia formam maior quantidade de osso novo, quando comparado aos outros grupos. Porém, neste presente trabalho este potencial já foi avaliado em um modelo de defeito ósseo crítico, diferente do trabalho de NULTY e colaboradores (2021), em que foi feito um modelo subcutâneo.

É interessante destacar que a análise realizada *in vitro* nos construídos, a fim de avaliar o perfil de mediadores secretados, já havia revelado um potencial

osteogênico e angiogênico dos grupos contendo os esferoides de ASCs não induzidos a hipertrofia semeados no arcabouço de PLA/CHA. De fato, os grupos contendo os esferoides apresentaram a formação de osso novo. No entanto, o grupo contendo esferoides induzidos a hipertrofia foi o que apresentou maior quantidade de osso neoformado e maior secreção de VEGF, o que corrobora nossa hipótese inicial do potencial destes esferoides para o reparo ósseo.

Dessa maneira, é possível notar que, de fato, o número de artigos que exploraram a combinação de esferoides com arcabouços para regeneração óssea é baixo, o que torna a estratégia abordada neste presente trabalho inovadora na área. Os grupos contendo esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia no arcabouço de PLA/CHA foram capazes de formar osso novo no local do defeito crítico. Porém, é interessante destacar que o grupo contendo os esferoides de ASCs induzidos a hipertrofia apresentou maior quantidade de osso neoformado ao longo dos períodos experimentais. A partir desse conjunto de resultados, é possível concluir que a abordagem desenvolvida neste trabalho pode ser considerada promissora para a área de medicina regenerativa e que construídos contendo esferoides induzidos a hipertrofia apresentam elevado potencial para a regeneração óssea.

8.7 BIOIMPRESSÃO DE ESFEROIDES

8.7.1 O processo de extrusão de esferoides vasculares em biotinta de fibrina não compromete sua morfologia e viabilidade

Neste presente trabalho, os esferoides vasculares de co-cultivo fabricados na proporção de 3bmMSCs:1HUVECs foram bioimpressos em biotinta de fibrina a partir da técnica de extrusão. Os esferoides apresentaram alta viabilidade, manutenção da morfologia e do seu diâmetro, após o processo de bioimpressão, quando comparado com os esferoides controles. Até o momento, poucos artigos foram publicados para promover a bioimpressão de esferoides, justamente por ser uma área considerada recente em Engenharia de Tecidos. No entanto, os artigos publicados apresentaram resultados promissores, a partir da técnica de extrusão (BULANOVA *et al.*, 2017; GOULART *et al.*, 2019; SWAMINATHAN *et al.*, 2020; COLLE *et al.*, 2020; BENMERIDJA *et al.*, 2020; HORDER *et al.*, 2021)

e de outras técnicas assistidas de bioimpressão, como por aspiração (UTAMA *et al.*, 2020; DALY *et al.*, 2021) e pelo método de “Kenzan” (MOLDOVAN *et al.*, 2017).

BULANOVA e colaboradores (2017) realizaram a biofabricação de uma glândula tireoide a partir da extrusão de esferoides de células da tireoide fabricados a partir da técnica de gota pendente. Após 24h do processo de bioimpressão, os esferoides apresentaram manutenção da sua morfologia e da sua capacidade de fusão. No artigo, os autores não avaliaram a viabilidade celular dos esferoides. Neste presente trabalho, também foi observado que os esferoides de co-cultivo mantiveram a sua morfologia, a partir das imagens de contraste de fase e análises histológicas.

No artigo publicado por MOLDOVAN e colaboradores (2017), esferoides de iPSCs foram bioimpressos a partir do método de “Kenzan” para a biofabricação de estruturas vasculares. Logo após o processo de bioimpressão, os esferoides ficaram com a morfologia um pouco prejudicada, devido a uma limitação do próprio método. No entanto, após 7 dias em cultivo, os esferoides se fusionaram entre si e apresentaram um remodelamento de sua morfologia. Neste presente trabalho, até 24h do processo de bioimpressão por extrusão, os esferoides de co-cultivo não apresentaram alteração em sua morfologia.

GOULART e colaboradores (2019) realizaram a bioimpressão, a partir da técnica de extrusão, de esferoides de iPSCs para biofabricação de construídos de fígado. Os autores observaram após 18 dias de cultivo, que os esferoides apresentaram alta viabilidade celular, a partir da análise de *LIVE/DEAD*®, assim como foi verificado neste presente trabalho com os esferoides de co-cultivo, porém em até 24 h.

SWAMINATHAN e colaboradores (2020) utilizaram a técnica de extrusão para bioimprimir esferoides do epitélio de mama em biotintas de Matrigel®, gelatina/alginato ou colágeno/alginato. Os autores observaram que os esferoides se mantiveram viáveis após 48 h do processo de bioimpressão. Além disso, a morfologia dos esferoides foi analisada após 96 h, onde também não foi observada alterações. Neste presente trabalho, foi analisada a viabilidade e morfologia dos esferoides de co-cultivo após 24 h, por um período mais curto. No entanto, em corroboração, também não foi observado nenhuma alteração de viabilidade ou de morfologia nos esferoides.

COLLE e colaboradores (2020) também utilizaram a técnica de extrusão, porém, para bioimprimir esferoides de ASCs em gelatina metacrilada (GelMA, *do inglês*, Gelatin-Methacrylamide) a partir de um padrão pré-definido. Os autores analisaram a viabilidade dos esferoides após a extrusão no período de 24 h e 7 dias. Em ambos os períodos, os esferoides se mantiveram viáveis após o processo de extrusão. Não foi realizada nenhuma análise para avaliação da morfologia. Neste presente trabalho, também foi observada uma alta viabilidade dos esferoides de co-cultivo após 24 h.

BENMERIDJA e colaboradores (2020) realizaram a bioimpressão por extrusão de esferoides de co-cultivo de ASCs e HUVECs em biotinta de GelMA. Os autores observaram uma alta viabilidade dos esferoides de co-cultivo após 7 dias do processo de extrusão. Além disso, os autores também analisaram a morfologia, a partir de coloração de Hematoxilina e Eosina, onde foi observado que os esferoides não apresentaram prejuízo em sua morfologia após a bioimpressão. Em corroboração, neste presente trabalho, esferoides de co-cultivo de bmMSCs/HUVECs também foram bioimpressos por extrusão, onde foi observada alta viabilidade celular após 24h e manutenção da morfologia. No entanto, neste presente trabalho, foi utilizada a fibrina como biotinta, pois como discutido previamente, ela é uma das biotintas que confere diferentes vantagens para abordagens em Engenharia de Tecidos (PARK e WOO, 2018).

UTAMA e colaboradores (2020) desenvolveram uma bioimpressora para que realiza a deposição automática de esferoides em uma matriz de hidrogel. No artigo, os autores utilizaram esferoides fabricados de diferentes linhagens tumorais. O principal objetivo em se utilizar o sistema automatizado com esses esferoides era para o uso em testes de drogas de alto rendimento. Após a deposição automática, os esferoides apresentaram uma viabilidade similar ao grupo controle. Além disso, a partir das imagens de contraste de fase, não foi observada nenhuma alteração na morfologia dos esferoides bioimpressos. Neste presente trabalho, também foi observada uma alta viabilidade dos esferoides de co-cultivo após 24h da extrusão e as análises por contraste de fase também não mostraram alterações na morfologia dos esferoides.

HORDER e colaboradores (2021) realizaram a bioimpressão por extrusão de esferoides de ASCs para combinação posterior com células de linhagem de câncer de mama, a fim de produzir um modelo tumoral mais complexo. Os

autores observaram que após a bioimpressão, os esferoides se mantiveram viáveis, assim como sua morfologia. Neste presente trabalho, também não foi observada nenhuma alteração de viabilidade ou de morfologia nos esferoides de co-cultivo.

DALY e colaboradores (2021) utilizaram um método de bioimpressão assistida para deposição automática de esferoides de MSCs em um hidrogel de suporte. Os autores observaram uma alta viabilidade dos esferoides após o processo de deposição automatizada e uma manutenção das suas propriedades funcionais. Além disso, os autores observaram que os esferoides foram capazes de se fundir entre si. Neste presente trabalho, não foi investigada a capacidade de fusão dos esferoides de co-cultivo. No entanto, estes se mantiveram viáveis após o processo de bioimpressão por extrusão.

Dessa maneira, a bioimpressão de esferoides é uma área de pesquisa considerada recente na literatura, como é possível notar a partir da discussão desenvolvida neste presente trabalho. A bioimpressão de esferoides vasculares ainda não foi explorada largamente e esse é o primeiro trabalho em que foi feita a bioimpressão de esferoides vasculares de co-cultivo de bmMSCs:HUVECs em biotinta de fibrina. A abordagem desenvolvida neste presente trabalho apresenta potencial para contribuir para a área de Engenharia de Tecidos, para a biofabricação de modelos vasculares e de modelos teciduais mais complexos, que apresentam o componente vascular em sua composição, como é o caso do tecido ósseo.

8.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste presente trabalho, foram desenvolvidas diferentes abordagens na área de Engenharia de Tecidos para biofabricação de tecido ósseo. Essas abordagens foram baseadas: (1) no cultivo de esferoides individualizados induzidos para a hipertrofia; (2) na fusão de esferoides não induzidos e induzidos para a via hipertrófica; (3) na combinação sinérgica de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos para a hipertrofia com o arcabouço de PLA/CHA; e (4) na pré-vascularização de construídos, a partir da biofabricação de esferoides vasculares de co-cultivo semeados no canal central de um arcabouço de PCL, contendo esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia (Fig. 85).

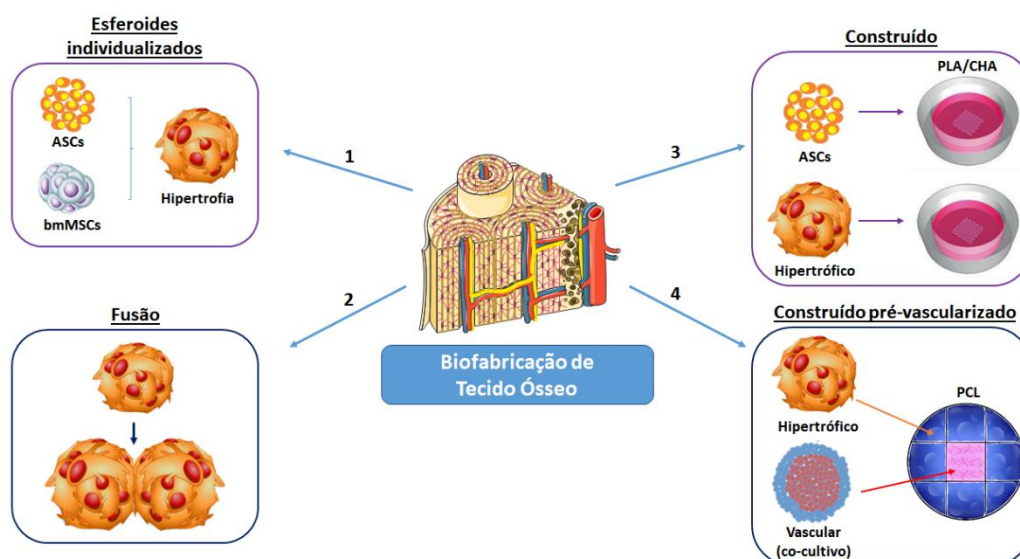


Figura 85: Estratégias em Engenharia de Tecidos para promover a biofabricação de tecido ósseo. As abordagens desenvolvidas neste presente trabalho foram baseadas: (1) no cultivo de esferoides de ASCs ou bmMSCs individualizados induzidos para a hipertrofia; (2) na fusão de esferoides não induzidos e induzidos para via hipertrófica; (3) na combinação sinérgica de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos para a hipertrofia com o arcabouço de PLA/CHA; e (4) na pré-vascularização de construídos, a partir da biofabricação de esferoides vasculares de co-cultivo semeados no canal central de um arcabouço de PCL, contendo esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia.

No caso do uso de esferoides individualizados de ASCs e bmMSCs, foi desenvolvido um modelo de indução baseado na hipertrofia. A hipótese, a partir dos resultados encontrados, é que os esferoides de ASCs e bmMSCs em um estágio não maduro de diferenciação osteogênica, possam contribuir de forma mais significativa para otimizar o processo de vascularização *in vivo* no local da lesão e, conseqüentemente, a regeneração óssea. Essa hipótese foi baseada devido ao fato dos esferoides de ASCs induzidos apresentarem elevada secreção e expressão gênica de VEGF, que é o principal fator responsável por promover o crescimento endotelial e também contribui para estimular a formação óssea durante a ossificação endocondral. Além disso, esses esferoides apresentaram uma elevada secreção de outros mediadores solúveis diretamente envolvidos com a angiogênese, como: IL-8 e bFGF. Essa maior funcionalidade foi observada nos esferoides de ASCs cultivados por 2 semanas em meio indutor condrogênico. Após esse período, houve uma redução significativa da secreção de mediadores solúveis pelos esferoides induzidos e da expressão gênica de VEGF, o que suporta essa hipótese. Por conta dos esferoides de ASCs induzidos

por duas semanas terem apresentado esse perfil mais ativo de secreção de mediadores envolvidos com a angiogênese e osteogênese, esse período de indução foi selecionado para as etapas posteriores do trabalho de combinação com o arcabouço.

Em relação aos esferoides de bmMSCs, não foi analisado o perfil de secreção ou gênico, pois o objetivo principal era avaliar as mudanças na própria matriz extracelular dos esferoides. Para mimetizar o processo de ossificação endocondral, espera-se que o molde de cartilagem seja formado de forma eficiente e que ocorra a substituição controlada por tecido ósseo no local. Foi observado que esses esferoides formaram uma matriz extracelular com componentes similares da cartilagem.

Durante a indução dos esferoides de ASCs, foi observado que estes apresentaram um comportamento biomecânico distinto e por conta disso, foi investigado seu comportamento de fusão ao longo de duas, três e cinco semanas de indução. Foi observado que a indução a hipertrofia pode impactar o uso de esferoides de ASCs como blocos de construção em estratégias de bioimpressão 3D. A hipótese para esse resultado é devido ao fato desses esferoides apresentarem uma resistência nítida ao processo de fusão a partir da terceira semana de cultivo. Por conta disso, a proposta é que os protocolos de biofabricação que utilizem esses esferoides sejam adaptados para a indução ocorrer ao final do processo. Além disso, foi observada uma possível relação entre a fusão e a otimização da diferenciação osteogênica dos esferoides de ASCs, visto que esses esferoides fusionados apresentaram em seu interior estruturas similares a cristais indicativos de mineralização na matriz extracelular.

A melhor compreensão do mecanismo de fusão dos esferoides de ASCs não induzidos e induzidos colaborou para a etapa seguinte deste trabalho, em que foi feita a fabricação de construídos, a partir da semeadura de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos no arcabouço de PLA/CHA. O interessante nesta etapa é que os esferoides não induzidos apresentaram inicialmente um comportamento diferente quando semeados na superfície do arcabouço. Esses esferoides foram altamente proliferativos, migraram e fusionaram em toda a área do biomaterial. No entanto, os esferoides induzidos após duas semanas em meio condrogênico, não aderiram no biomaterial. A hipótese para explicar esse resultado é que esferoides já estariam seguindo uma rota de diferenciação, o

que os torna mais comprometidos do que esferoides não induzidos. Esse comprometimento em uma via de diferenciação específica, leva a modificações na matriz extracelular dos esferoides, no perfil de secreção e de expressão gênica, no comportamento biomecânico e na capacidade de fusão, como já havia sido observado anteriormente, o que suporta essa hipótese. Por conta disso, os esferoides foram semeados no arcabouço após 48h do período indução e apresentaram alta adesão, secreção de matriz extracelular e capacidade de fusão. Também avaliamos a resposta funcional dos construídos *in vitro* e os grupos contendo os esferoides de ASC não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados, apresentaram uma elevada secreção de mediadores relacionados a angiogênese e osteogênese. Tal investigação foi necessária para também prever o comportamento dos construídos após o implante em modelo pré-clínico.

Os ensaios *in vivo* em modelo de defeito ósseo crítico de calvária em ratos mostraram, pela primeira vez, que os esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia semeados em PLA/CHA são capazes de formar osso novo na região central do defeito, o que suporta a hipótese de uma maior eficácia de uma estratégia sinérgica de Engenharia de Tecidos (arcabouço + esferoides) para regeneração tecidual. Além disso, o grupo contendo os esferoides induzidos a hipertrofia foi o que apresentou uma maior quantidade de osso neoformado, o que também suporta o potencial deste tipo de abordagem de cultivo para o reparo de lesões ósseas.

Por fim, como uma abordagem de pré-vascularização de construídos ósseos, foi feita a biofabricação de esferoides vasculares de co-cultivo e esses esferoides foram semeados no canal central de um arcabouço de PCL, contendo esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia. A funcionalidade dos esferoides vasculares de co-cultivo foi comprovada a partir de ensaios de formação de microvasos por *sprouting*. Os esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia se fusionaram eficientemente em toda a área do arcabouço de PCL e a hipótese é que a presença dos esferoides vasculares otimize a formação de tecido novo e em um microambiente de defeito ósseo crítico, otimize a vascularização no local do defeito e a regeneração óssea. No caso, quando análises histológicas foram realizadas do construído *in vitro*, a presença de depósitos de cálcio não foi elevada, o que era o desejado, visto que o objetivo

foi não utilizar o construído em um estágio muito elevado de maturação osteogênica. Além disso, foi observada uma alta densidade celular e produção de matriz extracelular no construído e nossa hipótese é que o uso do biorreator contribuiu positivamente para esse resultado. Após o período de dois meses de implante em modelo subcutâneo, foi observado macroscopicamente a formação de tecido novo nos grupos contendo o canal central preenchido por esferoides vasculares, o que suporta a hipótese.

Todas as abordagens em Engenharia de Tecidos desenvolvidas neste presente trabalho podem convergir com grande potencial para aplicações em bioimpressão 3D (Fig. 86), considerada inovadora em todo o território nacional e internacional. Inclusive, neste trabalho, os esferoides vasculares de co-cultivo foram, de fato, bioimpressos em biotinta de fibrina a partir da técnica de extrusão. Os resultados apresentados neste trabalho contribuem para a área de biofabricação e para o desenvolvimento de protocolos em bioimpressão 3D, baseados no uso de esferoides, para engenharia óssea. No caso, esferoides individualizados de ASCs ou bmMSCs podem ser utilizados como blocos de construção para bioimpressão 3D, preferencialmente sem cultivo prévio em meio indutor, pois foi mostrado neste trabalho, pela primeira vez, como ocorre a cinética de fusão desses esferoides após a indução hipertrófica. Esses esferoides podem ser utilizados para mimetizar os componentes celulares e de matriz extracelular do tecido ósseo. Além disso, biomateriais bioativos, como os que foram utilizados neste trabalho, podem ser utilizados na bioimpressora para contribuir na mimetização da composição da matriz extracelular óssea. Em adição, o uso de hidrogéis e fatores solúveis em técnicas de bioimpressão são necessários para a composição da biotinta, visto que otimizam a viabilidade do construído e processos subsequentes de diferenciação. Na imagem, foi feita a representação da fibrina com a adição de VEGF, como foi utilizado neste presente trabalho. Por fim, esferoides vasculares podem ser utilizados na bioimpressora para compor a porção vascular do tecido ósseo (Fig. 86), visto que são funcionais para estimular a produção de microvasos, conforme observado.

Em conclusão, todas essas estratégias podem apresentar potencial translacional em medicina regenerativa e podem convergir para aplicações em

bioimpressão 3D, a fim de produzir modelos teciduais ainda mais complexos para engenharia óssea.

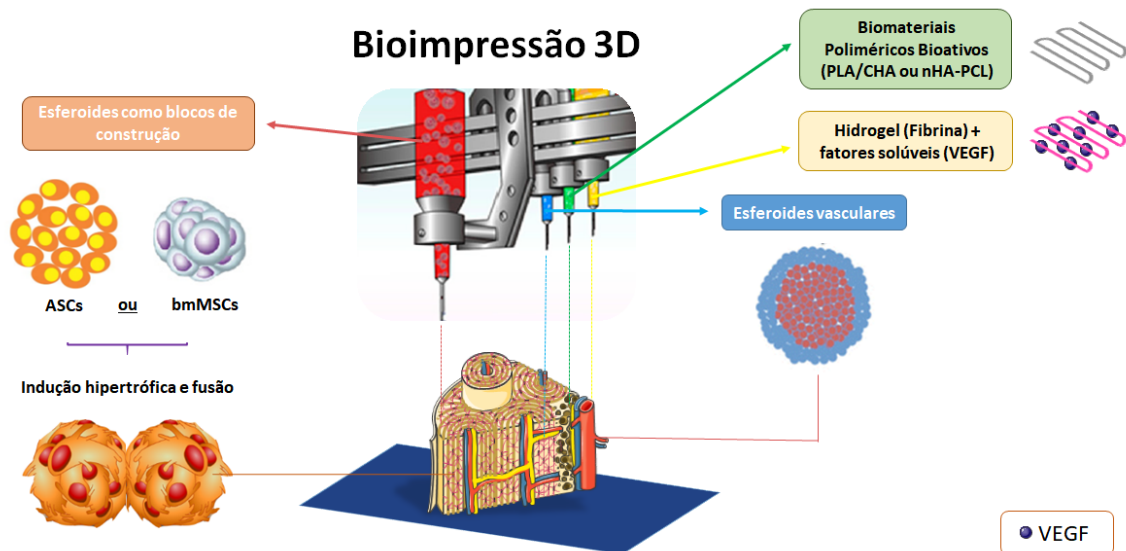


Figura 86: Bioimpressão 3D de tecido ósseo a partir de esferoides celulares como blocos de construção, biomateriais bioativos e biotintas. Para biofabricação de um modelo ósseo funcional é possível utilizar as estratégias desenvolvidas neste presente trabalho. No caso, esferoides de ASCs ou bmMSCs podem ser bioimpressos e em seguida, induzidos para a hipertrofia e fusionados, a fim de mimetizar componentes celulares e de matriz extracelular do tecido ósseo. Biomateriais poliméricos bioativos, como PLA/CHA e nHA-PCL, podem ser carregados na bioimpressora para mimetizar a matriz extracelular óssea. Em adição, hidrogéis com fatores de crescimento, como a fibrina e o VEGF, respectivamente, podem ser utilizados para promover a bioimpressão dos componentes biológicos do construído. Por fim, esferoides vasculares de co-cultivo podem ser bioimpressos para mimetizar a porção vascular do tecido ósseo.

9. CONCLUSÕES

9.1 PROPRIEDADES MORFOFUNCIONAIS DOS ESFEROIDES DE bmMSCS E ASCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA

- Os esferoides de ASCs apresentaram uma alta expressão de genes e secreção de mediadores solúveis relacionados a osteogênese e angiogênese após duas semanas de cultivo em meio indutor.
- Os esferoides de bmMSCs apresentaram a composição de matriz extracelular similar à encontrada no tecido cartilaginoso e uma alta produção de sGAG, após duas semanas de cultivo.

9.2 O PROCESSO DE FUSÃO DOS ESFEROIDES DE MSCs INDUZIDOS PARA A HIPERTROFIA

- Os esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia apresentaram uma resistência ao processo de fusão a partir de três semanas em meio indutor.
- Foi observado que os esferoides de ASCs fusionados parecem apresentar uma otimização da diferenciação osteogênica *in vitro*, devido maior produção de cálcio extracelular e de estruturas similares a cristais no interior dos esferoides.
- Os esferoides de bmMSCs apresentaram uma resistência ao processo de fusão após um período de sete dias de cultivo em meio indutor.
- Após 48 h de cultivo, esferoides de bmMSCs apresentam manutenção da capacidade de fusão após sementeira no arcabouço de PCL.

9.3 DESENVOLVIMENTO DE CONSTRUÍDOS *IN VITRO* A PARTIR DA SEMEADURA DE ESFEROIDES DE MSCS EM ARCABOUÇOS POLIMÉRICOS 3D IMPRESSOS

- Os esferoides de ASCs não induzidos apresentaram diferença no comportamento de adesão, migração e proliferação de acordo com a topografia do arcabouço de PLA/CHA.
- Os esferoides de ASCs induzidos para a hipertrofia por um período mais curto de cultivo, apresentaram maior sucesso na adesão, fusão e produção de matriz extracelular na superfície do arcabouço.
- A resposta funcional dos construídos, a partir da análise de secreção de mediadores solúveis, mostrou que esses apresentaram uma elevada secreção de VEGF, IL-6, IL-8 e RANTES nas semanas de cultivo analisadas, o que demonstra seu potencial angiogênico e osteogênico.
- Os esferoides de bmMSCs induzidos para a hipertrofia apresentaram elevada capacidade de adesão, proliferação, fusão, produção de matriz extracelular e de densidade celular, após sua interação com o arcabouço de PCL.

9.4 FABRICAÇÃO DE CONSTRUÍDOS PRÉ-VASCULARIZADOS *IN VITRO*

- Os esferoides vasculares apresentaram uma produção de microvasos *in vitro* por *sprouting* mais eficaz quando uma maior proporção de bmMSCs foi utilizada.
- Uma vez no canal central do arcabouço de PCL, os esferoides vasculares não prejudicaram o cultivo *in vitro* e após o período de implante subcutâneo, foi observado macroscopicamente a formação de tecido novo neste grupo.

9.5 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE OSSO NEOFORMADO EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

- Os construídos fabricados a partir da semeadura de esferoides de ASCs não induzidos e induzidos a hipertrofia em arcabouço de PLA/CHA e o arcabouço de PLA/CHA sozinho formaram osso novo na região central de defeito crítico de calvária em ratos a partir de três meses de implante.
- No caso do grupo de esferoides de ASCs induzidos a hipertrofia, foi observado osso novo após 1 mês de implante na região central do defeito. No período de seis meses, foi observada uma maior formação de tecido ósseo novo neste grupo.

9.6 BIOIMPRESSÃO DE ESFEROIDES VASCULARES

- Os esferoides vasculares apresentaram elevada viabilidade celular, manutenção da morfologia e do seu diâmetro após o processo de bioimpressão, quando comparado ao grupo controle.

9.7 CONCLUSÃO FINAL

Todos os resultados apresentados neste trabalho foram desenvolvidos a partir de estratégias em Engenharia de Tecidos para biofabricação de tecido ósseo. As estratégias baseadas em esferoides celulares de MSCs induzidos para a hipertrofia apresentam alto potencial para otimizar a regeneração óssea, devido a sua alta funcionalidade. Além disso, a investigação da cinética de fusão desses esferoides, os quais podem ser aplicados como blocos de construção, pode contribuir para o desenvolvimento de protocolos de bioimpressão 3D. A estratégia sinérgica de combinar esferoides de MSCs com arcabouços bioativos foi eficaz na formação de osso novo em modelo pré-clínico de defeito crítico. Por fim, a estratégia de pré-vascularização a partir de esferoides vasculares de co-cultivo apresenta grande potencial para formação de redes vasculares e, como consequência, para uma melhor regeneração óssea *in vivo*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASIA, F., GHANIANB, M., BAHARVAND, H., VAHIDIA, B., ESLAMINEJADC, M. Engineering mesenchymal stem cell spheroids by incorporation of mechanoregulator microparticles. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 84, p. 74-87, 2018.

ACHILLI, T-M., MEYER J., MORGAN J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 12, p. 1347-1360, 2012.

AGRAWAL, P., PRAMANIK, K. Enhanced chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in silk fibroin/chitosan/glycosaminoglycan scaffolds under dynamic culture condition. *Differentiation*, v. 110, p. 36-48, 2019.

AGUILAR, I., SMITH, L., OLIVOS, D., CHU, T-M., KACENA, M., WAGNER, D. Scaffold-free bioprinting of mesenchymal stem cells with the regenova printer: optimization of printing parameters. *Bioprinting*, v. 15, p. 1-18, 2019.

AHMAD, T., SHIN, H., LEE, J., SHIN, Y., KUMAR, S., PERIKAMANA, M., PARK, S., JUNG, H., SHIN, H. Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, v. 74, p. 464-477, 2018.

AHMED, H., SALERNOA, S., PISCIONERIA, A., KHAKPOURA, S., GIORNOA, L., DE BARTOLOA, L. Human liver microtissue spheroids in hollow fiber membrane bioreactor. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 160, p. 272-280, 2017.

AHN, J., LIM, J., JUSOH, N., LEE, J., PARK, T-P., KIM, Y., KIM, J., JEON, N. 3D Microfluidic bone tumor microenvironment comprised of hydroxyapatite/fibrin composite. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 1-13, 2019.

ALFORD, A.I., KOZLOFF, K.M., HANKENSON, K.D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 65, p. 20-31, 2015.

AMARILIO, R., VIUKOV, S. V., SHARIR, A., ESHKAR-OREN, I., JOHNSON, R. S., ZELZER, E. HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*, v. 134, p. 3917-3928, 2007.

APER, T., WILHELMI, M., GEBHARDT, C., HOEFFLER, K., BENECKE, N., HILFIKER, A., HAVERICH, A. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomaterialia*, v. 29, p. 21-32, 2016.

ASAI, A., AIHARA, E., WATSON, C., MOURYA, R., MIZUOCHI, T., SHIVAKUMAR, P., PHELAN, K., MAYHEW, C., HELMRATH, M., TAKEBE, T., WELLS, T., BEZERRA, J. Paracrine signals regulate human liver organoid maturation from iPSC. *Development*, v. 144, p. 1056-1064, 2017.

AUSPRUNK, D., FOLKMAN, J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular Research*, v. 14, p. 53-65, 1977.

BARANIAK, P., COOKEA, M., SAEEDA, R., KINNEYA, M., FRIDLEY, K., MCDEVITT, T. Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *J. Mech. Behavior of Biomedical Materials*, v. 11, p. 63-71, 2012.

BAPTISTA, L.S., PEDROSA, C.G.S., SILVA K.R., OTAZÚ, I.B., TAKYIA, C.M., DUTRA, H.S., CLÁUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R., ROSSI, M.I.D. Bone Marrow and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: How Close Are They? *Journal of Stem Cells*, v.2, 2007.

BAPTISTA, L., DO AMARAL, R., CARIAS, R., ANICETO, M., CLAUDIO-DA-SILVA, C., BOROJEVIC, R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*, v. 11, p. 706-715, 2009.

BAPTISTA, L.S., KRONEMBERGER, G.S., SILVA, K.R., GRANJEIRO, J.M. Spheroids of stem cells as endochondral templates for improved bone engineering. *Frontiers in Bioscience*, v. 23, p. 1969-1986, 2018.

BAPTISTA, L.S., KRONEMBERGER, G.S., CÔRTEZ, I., CHARELLI, L.E., MATSUI, R.A.M., PALHARES, T.N., SOHIER, J., ROSSI, A.M., GRANJEIRO, J.M. Adult Stem Cells Spheroids to Optimize Cell Colonization in Scaffolds for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 1-14, 2018.

BASTIDAS-CORAL, P., BAKKER, A. D., ZANDIEH-DOULABI, B., KLEVERLAAN, C. J., BRAVENBOER, N., FOROUZANFAR, T., KLEIN-NULEND, J. Cytokines TNF- α , IL-6, IL-17F, and IL-4 differentially affect osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Stem Cells International*, v. 2016, p. 1-9, 2016.

BAYER, E. A., GOTTARDI, R., FEDORCHAK, M. V., LITTLE, S. R. The scope and sequence of growth factor delivery for vascularized bone tissue regeneration. *Journal of Controlled Release*, v. 219, p. 129-140, 2015.

BEACHLEY, V., KASYANOV, V., NAGY-MEHESZ, A., NORRIS, R., OZOLANTA, I., KALEJS, M., STRADINS, P., BAPTISTA, L., DA SILVA, K., GRAINJERO, J., WEN, X., MIRONOV, V. The fusion of tissue spheroids attached to pre-stretched electrospun polyurethane scaffolds. *Journal of Tissue Engineering*, v. 5, p. 1-11, 2014.

BEATRICI, Anderson. Modelagem do cálculo de incerteza nos resultados de medição de propriedades biomecânicas de esferoides celulares em testes compressivos. 170 f. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Curso do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Duque de Caxias, 2018.

BELL, C.C., HENDRIKS, D.F., MORO, S.M., ELLIS, E., WALSH, J., RENBLUM, A., FREDRIKSSON PUIGVERT, L., DANKERS, A.C., JACOBS, F., SNOEYS, J., SISON-YOUNG, R.L., JENKINS, R.E., NORDLING, Å., MKRTCHIAN, S., PARK, B.K., KITTERINGHAM, N.R., GOLDRING, C.E., LAUSCHKE, V.M., INGELMAN-SUNDBERG, M. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Science Reports*, v. 6, 2016.

BARON, R. Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.

BEIER, J., HORCH, R., HESS, A., ARKUDAS, A., HEINRICH, J., LOEW, J., GULLE, H., POLYKANDRIOTIS, E., BLEIZIFFER, O., KNESER, U. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 4, p. 216-223, 2010.

BENMERIDJA, L., DE MOOR, L., MAERE, E., VANLAUWE, F., RYX, F., TYTGAT, L., VERCRUYSSSE, C., DUBRUEL, P., VAN VLIERBERGHE, S., BLONDEEL, P., DECLERCQ, H. High-throughput fabrication of vascularized adipose microtissues for 3D bioprinting. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 14, p. 840-854, 2020.

BENTLEY, K., MARIGGI, G., GERHARDT, H., BATES, P. Tipping the balance: robustness of tip cell selection, migration and fusion in angiogenesis. *Plos Computational Biology*, v. 10, p. 1-19, 2009.

BENTLEY, K., FRANCO, C., PHILIPPIDES, A., BLANCO, R., DIERKES, M., GEBALA, V., STANCHI F., JONES, M., ASPALTER, I., CAGNA, G., WESTRÖM, S., CLAESSION-WELSH, L., VESTWEBER, D., GERHARDT, H. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nature Cellular Biology*, v. 4, p. 309-321, 2014.

BERTASSONI, L. E., CARDOSO, J. C., MANOHARAN, V., CRISTINO, A. L., BHISE, N. S., ARAUJO, W. A., ZORLUTUNA, P., VRANA, N., GHAEMMAGHAMI, A., DOKMECI, M., KHADEMHOSEINI, A. Direct-write bioprinting of cell-laden methacrylated gelatin hydrogels. *Biofabrication*, v. 6, p. 1-12, 2014.

BHISE, N., MANOHARAN, V., MASSA, S., TAMAYOL, A., GHADERI, M., MISCUGLIO, M., LANG, Q., ZHANG, Y., SHIN, S., CALZONE, G., ANNABI, N., SHUPE, T., BISHOP, C., ATALA, A., DOKMECI, M., KHADEMHOSEINI, A. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids, v. 8, p. 1-13, 2016.

BILLS, C. E., EISENBERG, H., PALLANTE, S. L. Complexes of organic acids with calcium phosphate: the Von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *The Johns Hopkins Medical Journal*, v. 128, p. 194-207, 1974.

BIRMINGHAM, E., NIEBUR, G. L., MCHUGH, P. E., SHAW, G., BARRY, F. B., MCNAMARA, L. M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, v. 23, p. 13-27, 2012.

BOIRE, T., HIMMEL, L., YU, F., GUTH, C., DOLLINGER, B., WERFEL, T., BALIKOV, D., DUVALL, C. Effect of pore size and spacing on neovascularization of a biodegradable shape memory polymer perivascular wrap. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 3, p. 272-288, 2017.

BONEWALD, L. F., HARRIS, S. E., ROSSER, J., DALLAS, M. R., DALLAS, S. L., CAMACHO, N. P., BOYAN, B., BOSKEY, A. Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International*, v. 72, p. 537-547, 2003.

BOURIN P, BUNNELL B, CASTEILLA L, DOMINICI M, KATZ A, MARCH K, REDL H, RUBIN J, YOSHIMURA K, GIMBLE J. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society. *Cytotherapy*, v. 15, p. 641–648, 2013.

BRENNAN, M-A., DAVAINÉ, J-M., LAYROLLE, P. Pre-vascularization of bone tissue-engineered constructs. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 4, p. 1-3, 2013.

BREZULIER, D., PELLEN-MUSSI, P., TRICOT-DOLEUX, S., NOVELLA, A., SOREL, O., JEANNE, S. Development of a 3D human osteoblast cell culture model for studying mechanobiology in orthodontics. *European Journal of Orthodontics*, v. 42, p. 387-395, 2020.

BRUDERER, M., RICHARDS, R.G., ALINI, M., STODDART, M. J. Role and regulation of Runx2 in osteogenesis, v. 28, p. 269-286, 2014.

BUCKWALTER, J. A., GLIMCHER, M. J., COOPER, R. R., RECKER, R. Bone biology. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 77, p. 1256-1275, 1995.

BUCKWALTER, J. A., GLIMCHER, M. J., COOPER, R. R., RECKER, R. Bone biology. Part I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, v. 8, p. 1256-1275, 1995.

BULANOVA, E., KOUDAN, E., DEGOSSERIE, J., HEYMANS, C., PEREIRA, F., PARFENOV, V., SUN, Y., WANG, Q., AKHMEDOVA, S., SVIRIDOVA, I., SERGEEVA, N., FRANK, G., KHESUANI, Y., PIERREUX, C., MIRONOV, V. Bioprinting of 1 functional vascularized mouse thyroid gland construct. *Biofabrication*, v. 9, p. 1-33, 2017.

BURDIS, R., KELLY, D. J. 3D Bioprinting Hardware in Polymer-Based Additive Manufacturing. Cham: Springer International Publishing, p. 161–186, 2019.

BURDIS, R., KELLY, D. J. Biofabrication and bioprinting using cellular aggregates, microtissues and organoids for the engineering of musculoskeletal tissues. *Acta Biomaterialia*, v. 126, p. 1-14, 2021.

BYAMBAA, B., ANNABI, N., YUE, K., TRUJILLO-DE SANTIAGO, K., ALVAREZ, M., JIA, W., KAZEMZADEH-NARBAT, M., SHIN, R., TAMAYOL, A., KHADEMHOSEINI, A. Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue. *Advanced Healthcare Materials*, v. 6, p. 1-15, 2017.

CALASANS-MAIA, M. D., MELO, B. R., ALVES, A. T. N. N., RESENDE, R. F. B., LOURO, R. S., SARTORETTO, S. C., GRANJEIRO, J. M., ALVES, G. G. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, p. 599-608, 2015.

CAMPBELL, M., CHABRIA, M., FIGTREE, G.A., POLONCHUK, L., GENTILE, C. Stem Cell-Derived Cardiac Spheroids as 3D In Vitro Models of the Human Heart Microenvironment. *Methods in Molecular Biology*, 2018.

CAOA, Y., GONGA, Y., LIUB, L., ZHOUA, Y., FANGA, X., ZHANGA, C., LIA, Y., LIA, J. The use of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) as an in vitro model to assess the toxicity of nanoparticles to endothelium: a review. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, p. 1359-1369, 2017.

CAPLAN, A.I., BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Medicine*, v. 7, p. 259–264, 2001.

CARTMELL, S., EL HAJ, A. J. Mechanical bioreactors for tissue engineering. In *Bioreactors for tissue engineering* (Eds J. B. Chaudhuri and M. Al Rubeai), p.193-208, 2006 (Kluwer Academic Publishers).

CHARBORD, P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human Gene Therapy*, v. 21, p. 1045-1056, 2010.

CHEN, H-C., HU, Y-C. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology Letters*, v. 18, p. 1415-1423, 2006.

CHEN, E., LIU, G., ZHOU, X., ZHANG, W., WANG, C., HU, D. Concentration-dependent, dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38/MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Faseb. Journal*, v. 32, p. 4917-4929, 2018.

CHEN, S., YI, B., SU, L-B., ZHANG, Y-R., CHEN, C-L. *In vitro* evaluation of a novel osteo-inductive scaffold for osteogenic differentiation of bone-marrow mesenchymal stem cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, v. 31, p. 577-582, 2020.

CHOI, J., CHOI, W., JOO, Y., CHUNG, H., KIM, D., OH, S-J., KIM, S-H. FGF2-primed 3D spheroids producing IL-8 promote therapeutic angiogenesis in murine hindlimb ischemia. *NPJ Regenerative Medicine*, v. 6, 2021.

CIUFFI, S., ZONEFRATI, R., BRANDI, M.L. Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clinical Cases Mineral Bone Metabolism*, v. 14, p. 217-226, 2017.

COLLE, J., BLONDEEL, P., D BRUYNE, A., BOCHAR, S., TYTGAT, L., VERCRUYSE, C., VAN VLIERBERGHE, S., DUBRUEL, P., DECLERCQ, H. Bioprinting pre differentiated adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids with methacrylated gelatin ink for adipose tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 31, p. 1-15, 2020.

CÓRDOVA, L. A., LOI, F., LIN, T-H., GIBON, E., PAJARINEN, J., NABESHIMA, A., LU, L., YAO, Z., GOODMAN, S. B. CCL2, CCL5, and IGF-1 participate in the immunomodulation of osteogenesis during M1/M2 transition *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 105, p. 3069-3076, 2017.

CRITCHLEY, S., CUNNIFFE, G., O'REILLY, A., DIAZ-PAYNO, P., SCHIPANI, R., MCALINDEN, A., WITHERS, D., SHIN, J., ALSBERG, E., KELLY, DIKINA, A., ALT, D., HERBERG, S., MCMILLAN, A., STROBEL, H., ZHENG, Z., CAO, M., LAI, B., JEON, O., PETSINGER, V., COTTON, C., ROLLE, M., ALSBERG, E. A modular strategy to engineer complex tissues and organs. *Advanced Sciences*, v. 5, p. 1-17, 2018.

CRITCHLEY, S., CUNNIFFE, G., O'REILLY, A., DIAZ-PAYNO, P., SCHIPANI, R., MCALINDEN, A., WITHERS, D., SHIN, J., ALSBERG, E., KELLY, D. J. Regeneration of Osteochondral Defects Using Developmentally Inspired Cartilaginous Templates. *Tissue Engineering Part A*, v. 25, p. 159-171, 2019.

CUI, X., BOLAND, T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, v. 30, p. 6221-6227, 2009.

CUI, H., ZHU, W., HOLMES, B., ZHANG, L. Biologically inspired smart release system based on 3D bioprinted perfused scaffold for vascularized tissue regeneration. *Advanced Science*, v. 3, p. 1-10, 2016.

CUI, X., BOLAND, T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials*, v. 30, p. 6221-6227, 2009.

DAI, J., RABIE, A. B. M. VEGF: an essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *Journal of Dental Research*, v. 86, p. 937-950, 2007.

DALTON, P., WOODFIELD, T., MIRONOV, V., GROLL, J. Advances in hybrid fabrication toward hierarchical tissue constructs. *Advanced Science*, v. 7, p. 1-15, 2020.

DALY, A. C., CUNNIFFE, G. M., SATHY, B. N., JEON, O., ALSBERG, E., KELLY, D. J. 3D bioprinting of developmentally inspired templates for whole bone organ engineering. *Advanced Healthcare Materials*, v. 5, p. 2353-2362, 2016.

DALY, A., FREEMAN, F., GONZALEZ-FERNANDEZ, T., CRITCHLEY, S., NULTY, J., KELLY, D.J. 3D bioprinting for cartilage and osteochondral tissue engineering. *Advanced Healthcare Materials*, v. 22, p. 1-20, 2017.

DALY, A. C., KELLY, D.J. Biofabrication of spatially organised tissues by directing the growth of cellular spheroids within 3D printed polymeric microchambers. *Biomaterials*, p. 1-37. 2019.

DALY, A., DAVIDSON, M., BURDICK, J. 3D bioprinting of high cell-density heterogeneous tissue models through spheroid fusion within self-healing hydrogels. *Nature Communications*, v. 12, p. 1-13, 2021.

DATTA, P., AYAN, B., OZBOLAT, I. T. Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. *Acta biomaterialia*, v. 51, p. 1-20, 2017.

DARVISHI, B., MAJIDZADEH-A, K., GHADIRIAN, R., MOSAYEBZADEH, M., FARAHMAND, L. Recruited bone marrow derived cells, local stromal cells and IL-17 at the front line of resistance development to anti-VEGF targeted therapies. *Life Sciences*, v. 217, p. 34-40, 2019.

DE MOOR, L., FERNANDEZ, S., VERCRUYSE, C., TYTGAT, L., ASADIAN, M., DE GEYTER, N., VAN VLIERBERGHE, S., DUBRUEL, P., DECLERCQ, H. Hybrid bioprinting of chondrogenically induced human mesenchymal stem cell spheroids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, p. 1-20, 2020.

DERAKHSHANFAR, S., MBELECK, R., XU, K., ZHANG, X., ZHONG, W., XING, M. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: a review of recent trends and advances. *Bioactive Materials*, v. 3, p. 144-156, 2018.

DEVILLARD, R., PAGÈS, E., CORREA, M. M., KÉRIQUEL, V., RÉMY, M., KALISKY, J., ALI, M., GUILLOTIN, B., GUILLEMOT, F. Cell patterning by laser-assisted bioprinting. *Methods in Cell Biology*, v. 119, p. 159-174, 2014.

DHAWAN, A., KENNEDY, P., RIZK, E., OZBOLAT, I. Three-dimensional bioprinting for bone and cartilage restoration in orthopaedic surgery. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, v. 5, p. 215-226, 2019.

DILOKSUMPAN, P., BOLAÑOS, R. V., COKELAERE, S., POURAN, B., GRAUW, J., RIJEN, M., WEEREN, R., LEVATO, R., MALDA, J. Orthotopic bone regeneration within 3d printed bioceramic scaffolds with region-dependent porosity gradients in an equine model. *Advanced Healthcare Materials*, v. 9, p. 1-11, 2020.

DI STEFANO, A. B., MONTESANO, L., BELMONTE, B., GULINO, A., GAGLIARDO, C., FLORENA, A., BILELLO, G., MOSCHELLA, F., CORDOVA, A., BARONE, A., TOIA, F. Human spheroids from adipose-derived stem cells induce calvarial bone production in a xenogeneic rabbit model. *Annals of Plastic Surgery*, v. 6, p. 714-720, 2021.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D.J., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315-317, 2006.

DOMINGOS, M., GLORIA, A., COELHO, J., BARTOLO, P., CIURANA, J. Three-dimensional printed bone scaffolds: The role of nano/micro-hydroxyapatite particles on the adhesion and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 2017.

DU, M., ZHU, T., DUAN, X., GE, S., LI, N., SUN, Q. Acellular dermal matrix loading with bFGF achieves similar acceleration of bone regeneration to BMP-2 via differential effects on recruitment, proliferation and sustained osteodifferentiation of mesenchymal stem cells. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Applications*, v. 70, p. 62-70, 2017.

DUGUAY, D., FOTY, R. A., STEINBERG, M.S. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Development Biology*, v. 2532, p. 309-323, 2003.

DURAIN, G.D., BROWN, W.E., HU, J.C., ATHANASIOU, K.A. Emergence of scaffold-free approaches for tissue engineering musculoskeletal cartilages. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 43, p. 543-554, 2015.

DY, P., WANG, W., BHATTARAM, P., WANG, Q., WANG, L., BALLOCK, R. T., LEFEBVRE, V. Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Development Cell*, v.22, p. 597-609, 2012.

EICHHOLZ, K., VON EUW, S., BURDIS, R., KELLY, D. J., HOEY, D. A. Development of a new bone-mimetic surface treatment platform: nanoneedle hydroxyapatite (nnHA) coating. *Advanced Healthcare Materials*, v. 9, p. 1-18, 2020.

ELBERT, D. L. Bottom-up tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 674-680, 2011.

ELBERT, D. L. Bottom-up tissue engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 674-680, 2011.

FINDEISEN, L., BOLTE, J., VATER, C., PETZOLD, C., QUADE, M., MÜLLER, L., GOODMAN, S. M., ZWINGENBERGER, S. Cell spheroids are as effective as single cells suspensions in the treatment of critical-sized bone defects. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 22, p. 1-11, 2021.

FITZGERALD, S. J., COBB, J. S., JANORKAR, A. V. Comparison of the formation, adipogenic maturation, and retention of human adipose-derived stem cell spheroids in scaffold-free culture techniques. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 108, p. 3022-3032, 2020.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. *Ann. N Y Academy of Sciences*, v. 401, p. 212-227, 1982.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Research*, v. 43, p. 175-203, 1985.

FOLKMAN, J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? *Cancer Research*, v. 46, p. 467-473, 1986.

FORGACS, G., FOTY, R. A., SHAFRIR, Y., STEINBERG, M. S. Viscoelastic properties of living embryonic tissues: a quantitative study. *Biophysical Journal*, v. 74, p. 2227-2234, 1998.

FREEMAN, F., ALLEN, A., STEVENS, H., GULDBERG, R., MCNAMARA, L. Effects of *in vitro* endochondral priming and pre-vascularisation of human MSC cellular aggregates *in vivo*. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 6, p. 1-18, 2015.

FREEMAN, F. E., MCNAMARA, L. M. Endochondral priming: a developmental engineering strategy for bone tissue regeneration. *Tissue Eng, Part B: rev* 23, p. 128-141, 2017.

FREEMAN, S., RAMOS, R., CHANDO, A., ZHOU, L., REESER, K., JIN, S., SOMAN, P., YE, K. A bioink blend for rotary 3D bioprinting tissue engineered small-diameter vascular constructs. *Acta Biomaterialia*, v. 95, p. 152-164, 2019.

FREEMAN, F., BROWE, D., NULTY, J., VON EUW, S., GRAYSON, W. I., KELLY, DJ. Biofabrication of multiscale bone extracellular matrix scaffolds for bone tissue engineering. *European Cells and Materials*, v. 38, p. 168-187, 2019.

FU, J., WIRAJA, C., MUHAMMAD, H., XU, C., WANG, D-W. Improvement of endothelial progenitor outgrowth cell (EPOC)-mediated vascularization in gelatin-based hydrogels through pore size manipulation. *Acta Biomaterialia*, v. 58, p. 225-237, 2017.

FURUHATA, Y., KIKUCHI, Y., TOMITA, S., YOSHIMOTO, K. Small spheroids of adipose-derived stem cells with time-dependent enhancement of IL-8 and VEGF-A secretion. *Genes Cells*, v. 12, p. 1380-1386, 2016.

FURUMATSU, T., SHEN, Z., KAWAI, A., NISHIDA, K., MANABE, H., OOHASHI, T., INOUE, H., NINOMIYA, Y. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *Journal of Biochemistry*, v. 133, p. 633-639, 2003.

GERBER, H-P., VU, T., RYAN, A., KOWALSKI, J., WERB, Z., FERRARA, N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, v. 5, p. 623-628, 1999.

GRANATO, G., RUOCCO, M.R., IACCARINO, A., MASONE, S., CALÌ, G., AVAGLIANO, A., RUSSO, V., BELLEVICINE, C., DI SPIGNA, G., FIUME, G., MONTAGNANI, S., ARCUCCI, A. Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: an experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discovery*, v. 3, 2017.

W. L. GRAYSON, B. A. BUNNELL, E. MARTIN, T. FRAZIER, B. P. HUNG and J. M. GIMBLE. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, 2015.

GROLL, J., BOLAND, T., BLUNK, T., BURDICK, A. J., CHO, D-W., DALTON, P. D., DERBY, B., FORGACS, G., LI, Q., MIRONOV, V. Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, v. 8, p. 1-6, 2016.

GOMES, P. S., FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*, v. 45, p. 14-24, 2011.

GOPINATHAN, J., NOH, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomaterials Research*, v. 22, p. 1-15, 2018.

GOUDE, M. C., MCDEVITT, T. C., TEMENOFF, J. S. Chondroitin sulfate microparticles modulate transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis of human mesenchymal stem cell spheroids. *Cells, Tissues, Organs*, v. 199, p. 117-130, 2014.

GOULART, E., CAIRES-JUNIOR, L. C., TELLES-SILVA, K., ARAUJO, B., ROCCO, S., SFORCA, M., DE SOUSA, I., KOBAYASHI, G., MUSSO, C., ASSONI, M., OLIVEIRA, D., CALDINI, E., RAIA, S., LELKES, P., ZATZ, M. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro. *Biofabrication*, v. 12, p. 1-33, 2019.

GUDURIC, V., METZ, C., SIADOUS, R., BAREILLE, R., LEVATO, R., ENGEL, E., FRICAIN, J.-C., DEVILLARD, R., LUZANIN, O., CATROS, S. Layer-by-layer bioassembly of cellularized polylactic acid porous membranes for bone tissue engineering. *Tissue engineering constructs and cell substrates*, v. 78, p. 1-11, 2017.

GURUMURTHY, B., BIERDEMAN, C., JANORKAR, V. Spheroid model for functional osteogenic evaluation of human adipose derived stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 105, p. 1230-1236, 2017.

HAIJ, A., CARTMELL, S. Bioreactors for bone tissue engineering. *Proc. Inst. Mech Engineers*, v. 224, p. 1523-1532, 2010.

HAJDU, Z., MIRONOV, V., MEHESZ, A., NORRIS, R., MARKWALD, R., VISCONTI, R. Tissue spheroid fusion-based in vitro screening assays for analysis of tissue maturation. *J. Tissue Eng. Regen. Medicine*, v. 8, p. 659-664, 2010.

HAN, Z., BHAVSAR, M., LEPPIK L1., OLIVEIRA, K.M.C., BARKER, J.H. Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models. *Tissue Engineering part C – Methods*, v. 24, 2018.

HAO, Z., SONG, Z., HUANG, J., HUANG, K., PANETTA, A., GU, Z., WU, J. The scaffold microenvironment for stem cell-based bone tissue engineering. *Biomaterials Science*, 2017.

HANSMANN, J., GROEBER, F., KAHLIG, A., KLEINHANS, C., WALLES, H. Bioreactors in tissue engineering – principles, applications and commercial constraints. *Biotechnology Journal*, v. 8, p. 298-307, 2013.

HATA, K., TAKAHATA, Y., MURAKAMI, T., NISHIMURA, R. Transcriptional network controlling endochondral ossification. *Journal of Bone Metabolism*, v. 24, p. 75-82, 2017.

HE, B., OU, Y., CHEN, S., ZHAO, W., ZHOU, A., ZHAO, J. Designer bFGF-incorporated d-form self-assembly peptide nanofiber scaffolds to promote bone repair. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* v. 74, p. 451-458, 2017.

HE, Y., YU, L., LIU, J., LI, Y., WU, Y., HUANG, Z., WU, D., WANG, H., WU, Z., QIU, G. Enhanced osteogenic differentiation of human bone-derived mesenchymal stem cells in 3-dimensional printed porous titanium scaffolds by static magnetic field through up-regulating Smad4. *The FASEB Journal*, v. 33, p. 6069-6081, 2019.

HEO, D., HOSPODIUK, M., OZBOLAT, I. Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 95, p. 348-356, 2019.

HEO, D., AYAN, B., DEY, M., BANERJEE, D., WEE, H., LEWIS, G., OZBOLAT, I. Aspiration-assisted bioprinting of co-cultured osteogenic spheroids for bone tissue engineering. *Biofabrication*, 2020.

HERRERO, A. B., GARCÍA-GÓMEZ, A., GARAYOA, M., CORCHETE, L. A., HERNÁNDEZ, J. M. Effects of IL-8 up-regulation on cell survival and osteoclastogenesis in multiple myeloma. *Am. J. Pathology*, v. 186, p. 2171-2182, 2016.

HERRMANN, M., VERRIER, S., ALINI, M. Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair. *Frontier Bioengineering Biotechnology*, v. 3, p. 1-11, 2015.

HESSEL, R., FRESCHI, A., ROSADO, E., BARREIRO, L. Determining the Young's modulus on solids from the measurement of the speed of sound by the time-of-flight method. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 38, p. 1-10, 2016.

HO, S., KEOWN, A., ADDISON, A., LEACH, J. Cell migration and bone formation from mesenchymal stem cell spheroids in alginate hydrogels are regulated by adhesive ligand density. *Biomacromolecules*, v. 18, p. 4331-4340, 2017.

HOFFMANN, W., FELICIANO, S., MARTIN, I., DE WILD, M., WENDT, D. Novel perfused compression bioreactor system as an *in vitro* model to investigate fracture healing. *Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, p. 1-6, 2015.

HOLMAR, J., NOELS, H., BÖHM, M., BHARGAVA, S., JANKOWSKI, J., ORTH-ALAMPOUR, S. Development, establishment and validation of *in vitro* and *ex vivo* assays of vascular calcification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 530, p. 462-470, 2020.

HORDER, H., LASHERAS, M., GRUMMEL, N., NADERNEZHAD, A., HERBIG, J., ERGÜN, S., TEßMAR, J., GROLL, J., FABRY, B., BAUER-KREISEL, P., BLUNK, T. Bioprinting and differentiation of adipose-derived stromal cell spheroids for a 3d breast cancer-adipose tissue model. *Cells*, v. 10, p. 1-17, 2021.

HOU, Y., RYU, C., JUN, J., KIM, S. M., JEONG, C., JEUN, S-S. IL-8 enhances the angiogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by increasing vascular endothelial growth factor. *Cell Biology International*, v. 38, p. 1-10, 2014.

HU, J., LI, H., CHI, G., YANG, Z., ZHAO, Y., LIU, W., ZHANG, C. IL-1RA gene-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells in APA microcapsules could alleviate rheumatoid arthritis. *Int. J. Clin. Exp. Medicine*, v. 1, p. 1-8, 2015.

HU, K., OLSEN, B. Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Dev. Dynamics*, v. 246, p. 227-234, 2017.

HUANG, G-S., HSIEH, P-C., TSENG, C-S., HSU, C-H. The substrate-dependent regeneration capacity of mesenchymal stem cell spheroids derived on various biomaterial surfaces. *Biomaterials Science*, v. 2, p. 1652-1660, 2014.

HUANG, Y., HANG, X-F., GAO, G., YONEZAWA, T., CUI, X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. *Biotechnology Journal*, v. 12, p. 1-16, 2017.

HUANG, R. L., SUN, Y., HO, C. K., LIU, K., TANG, Q. Q., XIE, Y., LI, Q. IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPR1A-mediated pathways. *Cell Death and Disease*, v. 9, p. 1-15, 2018.

HUH, J-E.; LEE, S. Y. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis. *Biochimica et. Biophysica Acta (Bba) - Molecular Cell Research*, v. 1833, p. 2608-2616, 2013.

IAQUINTA, M.R., MAZZONI, E., MANFRINI, M., D'AGOSTINO, A., TREVISIOL, L., NOCINI, R., TROMBELLI, L., BARBANTI-BRODANO, G., MARTINI, F., TOGNON, M. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, p. 1-17, 2019.

ISHIHARA, K., NAKAYAMA, K., AKIEDA, S., MATSUDA, S., IWAMOTO, Y. Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, v. 9, p. 1-10, 2014.

ITKIN, T., GUR-COHEN, S., SPENCER, J. A., SCHAJNOVITZ, A., RAMASAMY, S. K., KUSUMBE, A. P., LEDERGOR, G., JUNG, Y., MILO, I., POULOS, M. G., KALINKOVICH, A., LUDIN, A., KOLLET, O., SHAKHAR, G., BUTLER, J., RAFII, S., ADAMS, R., SCADDEN, D., LIN, C., LAPIDOT, T. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis, v. 532, p. 323–328, 2016.

JAFARKHANI, M., SALEHI, Z., AIDUN, A., SHOKRGOZAR, M. Bioprinting in vascularization strategies. *Iran. Biomedical Journal*, v. 23, p. 9-20, 2019.

JI, S., ALMEIDA, E., GUVENDIREN, M. 3D bioprinting of complex channels within cell-laden hydrogels. *Acta Biomaterialia*, v. 95, p. 214-224, 2019.

JIA, J., RICHARDS, DJ., POLLARD, S., TAN, Y., RODRIGUEZ, J., VISCONTI, RP., TRUSK, T., YOST, M., YAO, H., MARKWALD, R., MEI, Y. Engineering alginate as bioink for bioprinting. *Acta biomaterialia*, v.10, p. 323-331, 2014.

JOHNSON, B., CLAY, T., HOBEIKA, A., LYERLY, A., MORSE, M. Vascular endothelial growth factor and immunosuppression in cancer: current knowledge and potential for new therapy. *Expert Opin. Biol. Therapy*, v. 4, p. 449-460, 2007.

JONES, E., MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology*, v. 47, p. 126-131, 2008.

JUNG, Y. K., KIM, G. W., PARK, H. R., LEE, E. J., CHOI, J. Y., BEIER, F. Role of interleukin-10 in endochondral bone formation in mice: anabolic effect via the bone morphogenetic protein/Smad pathway. *Arthritis Rheumatology*, v. 65, p. 3153-3164, 2013.

JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 10^a ed, 2008.
KANG, Y., CHANG, J. Channels in a porous scaffold: a new player for vascularization. *Regenerative. Medicine*, v. 13, p. 705-715, 2018.

KATO, M. New insights into IFN- γ in rheumatoid arthritis: role in the era of jak inhibitors. *Immunological Medicine*, v. 43, p. 72-78, 2020.

KHETANI, S. R., BHATIA, S. N. Engineering tissues for in vitro applications. *Curr. Opin. Biotechnol*, v. 17, p. 524–531, 2006.

KIM, H. J., PARK, J-S. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. *Development and Reproduction*, v. 21, p. 1-10, 2017.

KIM, E., LEE, Y., KIM, S-J., PARK, J., LEE, J., KIM, S., PARK, H., SHIN, H. Fabrication of core-shell spheroids as building blocks for engineering 3D complex vascularized tissue. *Acta Biomaterialia*, v. 100, p. 158-172, 2019.

KELM, J. M., FUSSENEGGER, M. Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, p. 753-764, 2010.

KEHTARI, M., ZEYNALI, B., SOLEIMANI, M., KABIRI, M., SEYEDJAFARI, E. Fabrication of a co-culture micro-bioreactor device for efficient hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 46, p. 161-170, 2018.

KLOTZ, B. J., LIM, K. S., CHANG, Y. X., SOLIMAN, B. G., PENNINGS, I., MELCHELS, F. P. W., WOODFIELD, T. B. F., ROSENBERG, A. J. W. P., MALDA, J., GAWLITTA, D. Engineering of a complex bone tissue model with endothelialised channels and capillary-like networks. *European Cells and Materials*, v. 35, p. 335-349, 2018.

KOSUGE, D., KHAN, W. S., HADDAD, B., MARSH, D. Biomaterials and scaffolds in bone and musculoskeletal engineering. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, p. 185-191, 2013.

KRONEMBERGER, Gabriela Soares. Produção de esferoides a partir de células-tronco/estromais de tecido adiposo humano para biofabricação de tecido ósseo. Duque de Caxias, 2018. Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, 2018.

KUSUMBE, A. P., RAMASAMY, S. K., ITKIN, T., MAE, M. A., LANGEN, U. H., BETSHOLTZ, C., LAPIDOT, T., ADAMS, R. H. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells, v. 532, p. 380–384, 2016.

LAM, J., BELLAYR, I., MARKLEIN, R., BAUER, S., PURI, R., SUNG, K. Functional profiling of chondrogenically induced multipotent stromal cell aggregates reveals transcriptomic and emergent morphological phenotypes predictive of differentiation capacity. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 7, p. 664-675, 2018.

LASCHKE, M., MUSSAWY, H., SCHULER, S., KAZAKOV, A., RÜCKER, M., EGLIN, D., ALINI, M., MENDER, M. Short-term cultivation of in situ prevascularized tissue constructs accelerates inosculation of their preformed microvascular networks after implantation into the host tissue. *Tissue Engineering Part A*, v. 17, p. 841-853.

LASCHKE, M. W., SCHANK, T. E., SCHEUER, C., KLEER, S., SCHULER, S., METZGER, W., EGLIN, D., ALINI, M., MENDER, M. D. Three-dimensional spheroids of adipose-derived mesenchymal stem cells are potent initiators of blood vessel formation in porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 6876-6884, 2013.

LASCHKE, M., SCHANK, T., SCHEUER, C., KLEER, S., SHADMANOV, T., EGLIN, D., ALINI, M., MENDER, M. *In vitro* osteogenic differentiation of adipose-derived

mesenchymal stem cell spheroids impairs their in vivo vascularization capacity inside implanted porous polyurethane scaffolds. *Acta Biomaterialia*, p. 1-23, 2014.

LASCHKE, M.W., MENDER, M.D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends in biotechnology*, v. 35, p. 133-144, 2016.

LEE, V., LANZI, A., HAYGAN, N., YOO, S-S., VINCENT, P., DAI, G. Generation of multi-scale vascular network system within 3D hydrogel using 3D bio-printing technology. *Cell. Mol. Bioengineering*, v. 7, p. 460-472, 2014.

LEE, J., LEE, S., AHMAD, T., PERIKAMANA, S. K. M., LEE, J., KIM, E. M., SHIN, H. Human adipose-derived stem cell spheroids incorporating platelet-derived growth factor (PDGF) and bio-minerals for vascularized bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 255, p. 1-57, 2020.

LEHMANN, M., MARTIN, F., MANNIGEL, K., KALTSCHMIDT, K., SACK, U., ANDERER, U. Three-dimensional scaffold-free fusion culture: the way to enhanced chondrogenesis of in vitro propagated human articular chondrocytes. *European Journal of Histochemistry*, v. 57, p. 205-215, 2013.

LI, L., LI, J., ZOU, Q., ZUO, Y., CAI, B., LI, Y. Enhanced bone tissue regeneration of a biomimetic cellular scaffold with co-cultured MSCs-derived osteogenic and angiogenic cells. *Cell Proliferation*, v. 52, p. 1-12, 2019.

LINDROOS, B., SUURONEN, R., MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Reviews and Reports*, v. 7, p. 269-291, 2011.

LIU, C., ABEDIAN, R., MEISTER, R., HAASPER, C., HURSCHLER, C., KRETTEK, C., VON LEWINSKI, G., JAGODZINSKI, M. Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*, v. 33, p. 1052-1064, 2012.

LIU, TM., LEE, EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 19, p. 254-263, 2013.

LIU, Y-C.; KAO, Y-T.; HUANG, W-K.; LIN, K-Y; WU, S-C; HSU, S-C; SCHUYLER, S. C.; LI, L-Y; LU, F. L.; LU, J. CCL5/RANTES is important for inducing osteogenesis of human mesenchymal stem cells and is regulated by dexamethasone. *Bioscience Trends*, v. 8, p. 138-143, 2014.

LIU, W., ZHANG, Y. S., HEINRICH, M. A., DE FERRARI, F., JANG, H. L., BAKHT, S. M., ALVAREZ, M., YANG, J., LI, Y-C., TRUJILLO-DE SANTIAGO, G., MIRI, A., ZHU, K., KHOSHAKHLAGH, P., PRAKASH, G., CHENG, H., GUAN, X., ZHONG, Z., JU, J., ZHU, G., JIN, X., SHIN, X., DOKMECI, M., KHADEMHOSEINI, A. Rapid continuous multimaterial extrusion bioprinting. *Advanced Materials*, v. 29, p. 1-8, 2017.

LLOYD-GRIFFITH, C., MCFADDEN, T., DUFFY, G., UNGER, R., KIRKPATRICK, C., O'BRIEN, J. The pre-vascularisation of a collagen-chondroitin sulphate scaffold using human amniotic fluid-derived stem cells to enhance and stabilise endothelial cell-mediated vessel formation. *Acta Biomaterialia*, v. 26, p. 263-273, 2015.

LUBY, A., RANGANATHAN, K., LYNN, J., NELSON, N., DONNEYS, A., BUCHMAN, S. Stem cells for bone regeneration: current state and future directions. *The Journal of Craniofacial Surgery*, v. 30, p. 730-735, 2019.

LUTOLF, M.P., LAUER-FIELDS, J. L., SCHMOECKEL, H. G., METTERS, A. T., WEBER, F. E., FIELDS, G. B., HUBBELL, J. A. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 5413–5418, 2003.

LUTOLF, M. P., HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, v. 23, p. 47-55, 2005.

MACKIE, E. J., AHMED, Y. A., TATARCZUCH, L., CHEN, K-S., MIRAMS, M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, p. 46–62, 2008.

MACKIE, E. J., TATARCZUCH, L., MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*, v. 211, p. 109–121, 2011.

MAES, C., KOBAYASHI, T., SELIG, M. K., TORREKENS, S., ROTH, S. I., MACKEM, S., CARMELIET, G., KRONENBERG, H. M. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, v. 19, p. 329-344, 2010.

MAIA-PINTO, M., BROCHADO, A., TEIXEIRA, B., SARTORETTO, S., UZEDA, M., ALVES, A., ALVES, G., CALASANS-MAIA, M., THIRÉ, R. Biomimetic mineralization on 3D printed PLA scaffolds: on the response of human primary osteoblasts spheroids and in vivo implantation. *Polymers*, v. 13, p. 1-26, 2021.

MANDRYCKY, C., WANG, Z., KIM, K., KIM, D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 422-434, 2016.

MARKWAY, B., TAN, G-K., BROOKE, G., HUDSON, J., COOPER-WHITE, J., DORAN, M. Enhanced chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in low oxygen environment micropellet cultures. *Cell Transplantation*, v. 19, p. 29-42, 2010.

MASSAI, D., ISU, G., MADEDDU, D., CERINO, G., FALCO, A., FRATI, C., GALLO, D., DERIU, M., LABATE, G., QUAINI, F., AUDENINO, A., MORBIDUCCI, U. A versatile bioreactor for dynamic suspension cell culture. Application to the culture of cancer cell spheroids. *Plos One*, v. 11, p. 1-16, 2016.

MARTINO, M., BRKIC, S., BOVO, E., BURGER, M., SCHAEFER, D., WOLFF, T., GÜRKE, L., BRIQUEZ, P., LARSSON, H., GIANNI-BARRERA, R., HUBBELL, J., BANFI, A. Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, p. 1-8, 2015.

MATZIOLIS, D., TUISCHER, J., MATZIOLIS, G., KASPER, G., DUDA, G., PERKA, C. Osteogenic predifferentiation of human bone marrow-derived stem cells by short-term mechanical stimulation. *The Open Orthopaedics Journal*, v. 5, p. 1-6, 2011.

MEAD, T. J. Alizarin red and alcian blue preparations to visualize the skeleton. *Methods in Molecular Biology*, p. 207-212, 2019.

MELINCOVICI, C. S., BOŞCA, A. B., ŞUŞMAN, S., MĂRGINEAN, M., MIHU, C., ISTRATE, M., MOLDOVAN, I. M., ROMAN, A., MIHU, C. Vascular endothelial growth

factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryology*, v. 59, p. 455-467, 2018.

MERCADO-PAGÁN, A., STAHL, A., SHANJANI, Y., YANG, Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 3, p. 718-729, 2015.

MICHALOPOULOS, E., KNIGHT, R., KOROSSIS, S., KEARNEY, J., FISHER, J., INGHAM, E. Development of methods for studying the differentiation of human mesenchymal stem cells under cyclic compressive strain. *Tissue Engineering Part A*, v. 18, p. 252-262, 2011.

MIRDAMADI, E., TASHMAN, J., SHIWARSKI, D., PALCHESKO, R., FEINBERG, A. FRESH 3D bioprinting a full-size model of the human heart. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 6, p. 6453-6459, 2020.

MIRI, A., KHALILPOUR, A., CECEN, B., MAHARJAN, S., SHIN, S., KHADEMHOSEINI, S. Multiscale bioprinting of vascularized models. *Biomaterials*, v. 198, p. 204-216, 2018.

MIRON, R. J., ZHANG, YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of Dental Research*, v. 91, p. 736-744, 2012.

MIRONOV, V., VISCONTI, R., KASYANOV, V., FORGACS, G., DRAKE, C., MARKWALD, R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, v. 30, p. 2164-2174, 2009.

MIRONOV, V., KASYANOV, V., MARKWALD, R. Organ printing: from bioprinter to organ biofabrication line. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, p. 667-673, 2011.

MIRONOV, V., VISCONTI, R., KASYANOV, V., FORGACS, G., DRAKE, C., MARKWALD, R. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, v. 30, p. 2164-2174, 2013.

MISHRA, R., ROUX, B., POSUKONIS, M., BODAMER, E., BREY, E., FISHER, J., DEAN, D. Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly (propylene fumarate)/fibrin scaffolds. *Biomaterials*, v. 77, p. 255-266, 2016.

MOLDOVAN, L., BARNARD, A., GIL, C-H., LIN, Y., GRANT, M., YODER, M., PRASAIN, N., MOLDOVAN, N. iPSC-derived vascular cell spheroids as building blocks for scaffold-free biofabrication. *Biotechnology Journal*, v. 12, p. 1-24, 2017.

MOON, J., WEST, J. Vascularization of engineered tissues: approaches to promote angio-genesis in biomaterials. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 4, p. 300-310, 2008.

MONTUFAR-SOLIS, D., NGUYEN, H. C., NGUYEN, H. D., HORN, W. N., CODY, D. D., DUKE, P. J. Using cartilage to repair bone: an alternative approach in tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 32, p. 504-509, 2004.

MORAES, L., SILVA, E., SILVA, D., PAULA, A. Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 - 2010): análise dos fatores associados. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 17, p. 719-734, 2014.

MORITANI, Y., USUI, M., SANO, K., NAKAZAWA, K., HANATANI, T., NAKATOMI, M., IWATA, T., SATO, T., ARIYOSHI, W., NISHIHARA, T. Spheroid culture enhances

osteogenic potential of periodontal ligament mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontal Research*, v. 53, p. 870-882, 2018.

MURAGLIA, A., CORSI, A., RIMINUCCI, M., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., BIANCO, P., QUARTO, R. Formation of a chondro-osseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 2949-2955, 2003.

MURPHY, S., ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 773–785, 2014.

MURSHED, M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, v. 12, p. 1-12, 2018.

MURATA, D., TOKUNAGA, S., TAMURA, T., KAWAGUCHI, H., MIYOSHI, N., FUJIKI, M., NAKAYAMA, K., MISUMI, K. A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, v. 10, 2015.

MURSHED, M. Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harb. Perspectives in Medicine*, v. 8, p. 1-11, 2018.

MURPHY, S. V., ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 773-785, 2014.

MURPHY, K., FANG, S., LEACH, J. Human mesenchymal stem cell spheroids in fibrin hydrogels exhibit improved cell survival and potential for bone healing. *Cell and Tissue Research*, v. 357, p. 91-99, 2014.

MURPHY, K., WHITEHEAD, J., ZHOU, D., HO, S., LEACH, J. Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids. *Acta Biomaterialia*, v. 64, p. 176-186, 2017.

NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R., DE CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v. 108, p. 17-29, 2002.

NAKATANI, T., CHEN, T., PARTRIDGE, N. C. MMP-13 is one of the critical mediators of the effect of HDAC4 deletion on the skeleton. *Bone*, v. 90, p. 142-151, 2016.

NASHIMOTO, Y., HAYASHI, T., KUNITA, I., NAKAMASU, A., TORISAWA, Y., NAKAYAMA, M., TAKIGAWA-IMAMURA, H., KOTERA, H., NISHIYAMA, K., MIURAC, T., YOKOKAWA, R. Integrating perfusable vascular networks with a three-dimensional tissue in a microfluidic device. *Integrative Biology*, v. 9, p. 506-518, 2017.

NASRABADI, D., REZAEIANI, S., ESLAMINEJAD, M. B., SHABANI, A. Improved protocol for chondrogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells-effect of PTHRP and FGF-2 on TGFB1/BMP2-induced chondrocytes hypertrophy. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 14:755-766, 2018.

NG, K., ROMAS, E., DONNAN, L. Bone Biology. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metabolism*, v. 11, p. 1-22, 1997.

NG, J., SPILLER, K., BERNHARD, J., VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Biomimetic approaches for bone tissue engineering. *Tissue Engineering Part B*, v. 23, p. 480-493, 2017.

NGUYEN, L H., ANNABI, N., NIKKHAH, M., BAE, H., BINAN, L., BINAN, L., PARK, S., KANG, Y., YANG, Y., KHADEMHOSEINI, A. Vascularized Bone Tissue Engineering: Approaches for Potential Improvement. *Tissue Engineering: Part B*, v. 18, p. 363-382, 2012.

NICHOL, J. W., KHADEMHOSEINI, A. Modular tissue engineering: engineering biological tissues from the bottom up. *Soft Matter*, v. 5, p. 1312, 2009.

NING, L., CHEN, X. A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing. *Biotechnology Journal*, v. 12, p. 1-16, 2017.

NOKHBATOLFOGHAEI, H., RAD, M., KHANI, M-M., SHAHRIARI, S., NADJMI, N., KHOJASTEH, A. Application of bioreactors to improve functionality of bone tissue engineering constructs: a systematic review. *Curr. Stem Cell Res. Therapy*, v. 7, p. 564-599, 2017.

NOORI, A., ASHRAFI, S., VAEZ-GHAEMI, R., HATAMIAN-ZAREMI, A., WEBSTER, T. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4937-4961, 2017.

NOROTTE, C., MARGA, F., NIKLASON, L., FORGACS, G. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials*, v. 30, p. 5910-5917, 2009.

NOVOSEL, E., KLEINHANS, C., KLUGER, P. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 63, p. 300-311, 2011.

NULTY, Jessica. The development of a novel 3D bioprinting strategy to drive vascularisation, and its application for bone tissue engineering. 217 p. Thesis (Doctorate) - Trinity College Dublin, Dublin, 2020.

NULTY J., BURDIS, R., KELLY, D. J. Biofabrication of Prevascularised Hypertrophic Cartilage Microtissues for Bone Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 1-16, 2021.

OBERRINGER, M., BUBEL, M., JENNEWEIN, M., GUTHÖRL, S., MORSCH, T., BACHMANN, S., METZGER, W., POHLEMANN, T. The role of adipose-derived stem cells in a self-organizing 3D model with regard to human soft tissue healing. *Mol. Cell Biochemistry*, v. 445, p. 195-210, 2018.

OMELYANENKO, N., KARALKIN, P., BULANOVA, E., KOUDAN, E., PARFENOV, V., RODIONOV, S., KNYAZEVA, A., KASYANOV, V., BABICHENKO, I., CHKADUA, T., KHESUANI, Y., GRYADUNOVA, A., MIRONOV, V. Extracellular matrix determines biomechanical properties of chondrospheres during their maturation in vitro. *Cartilage*, v. 1, p. 1-11, 2018.

ORCIANI, M., FINI, M., DI PRIMIO, R., MATTIOLI-BELMONTE, M. Biofabrication and bone tissue regeneration: cell source, approaches, and challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 5, p. 1-15, 2017.

OVSIANIKOV, A., KHADEMHOSEINI, A., MIRONOV, V. The synergy of scaffold-based and scaffold-free tissue engineering strategies. *Trends in Biotechnology*, v. 36, p. 348-357, 2018.

OZBOLAT, I. T., PENG, W., OZBOLAT, V. Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today*, v. 21, p. 1257-1271, 2016.

PAGLIARI, S., TIRELLA, A., AHLUWALIA, A., DUIM, S., GOUMANS, M-J., AOYAGI, T., FORTE, G. A multistep procedure to prepare pre-vascularized cardiac tissue constructs using adult stem cells, dynamic cell cultures, and porous scaffolds. *Frontiers in Physiology*, v. 5, p. 1-12, 2014.

PAIVA, K. B., GRANJEIRO, J. M. Bone tissue remodeling and development: focus on matrix metalloproteinase functions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 561, p. 74-87, 2014.

PALHARES, T. N., MENEZES, L. R., KRONEMBERGER, G. S., BORCHIO, P. G. M., BAPTISTA, L. S., PEREIRA, L. C. B., SILVA, E. O. Production and characterization of poly (lactic acid)/nanostructured carboapatite for 3D printing of bioactive scaffolds for bone tissue engineering. *3D Printing and Additive Manufacturing*, v. 8, p. 227-237, 2021.

PANNARALE, L., MORINI, S., D'UBALDO, E., GAUDIO, E., MARINOZZI, G. SEM corrosion-casts study of the microcirculation of the flat bones in the rat. *Anat. Record*, v. 247, p. 462-471, 1997.

PAPADOPOULOS, N., MARTIN, J., RUAN, Q., RAFIQUE, A., ROSCONI, M. P., SHI, E., PYLES, E. A., YANCOPOULOS, G. D., STAHL, N., WIEGAND, S. J. Binding and neutralization of vascular endothelial growth factor (VEGF) and related ligands by VEGF Trap, ranibizumab and bevacizumab. *Angiogenesis*, v. 15, p. 171-185, 2012.

PARDANAUD, L., YASSINE, F., DIETERLEN-LIEVRE, F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and hematopoiesis during avian ontogeny. *Development*, v. 105, p. 473-485, 1989.

PARK, M. J., LEE, J., BYEON, J. S., JEONG, D. U., GU, N. Y., CHO, I. S. Effects of three-dimensional spheroid culture on equine mesenchymal stem cell plasticity. *Vet. Res. Communication*, v. 42, p. 171-181, 2018.

PARK, C., WOO, K. Fibrin-based biomaterial applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Adv. Exp. Med. Biology*, v. 1064, p. 253-261, 2018.

PATAN, S., HAENNI, B., BURRI, P. H. Evidence for intussusceptive capillary growth in the chicken chorio-allantoic membrane (CAM). *Anat. Embryology*, v. 187, p. 121-130, 1993.

PATAN, S., HEANNI, B., BURRI, P. H. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvascular Research*, v. 51, p. 80-98, 1996.

PATAN, S., HAENNI, B., BURRI, P. H. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): Pillar formation by capillary fusion. *Microvascular Research*, v. 53, p. 33-52, 1997.

PATAN, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology*, v. 50, p. 1-15, 2000.

PATAN, S. Vasculogenesis and angiogenesis. Angiogenesis in Brain Tumors, Chapter 1, Kluwer Academic Publishers, 2004.

PATIL, A. S., SABLE, R. B., KOTHARI, R. M. Occurrence, biochemical profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms and their functions in endochondral ossification. *Journal of Cellular Physiology*, v. 227, p. 1298-1308, 2012.

PECK, S., BENDIGO, J., TOBIAS, J., DODGE, G., MALHOTRA, N., MAUCK, R., SMITH, L. Hypoxic preconditioning enhances bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival in a low oxygen and nutrient-limited 3D microenvironment. *Cartilage*, v. 1, p. 1-14, 2019.

PILLET, F., GIBOT, L., MADI, M., ROLS, M-P., DAGUE, E. Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model. *Biofabrication*, v. 9, p. 1-10, 2017.

PINHEIRO, M., EIS, S. Epidemiologia de fraturas pela osteoporose no Brasil: o que temos e o que precisamos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabolismo*, v. 54, p. 1-7, 2010.

POTAPOVA, I. A., GAUDETTE, G. R., BRINK, P. R., ROBINSON, R. B., ROSEN, M. R., COHEN, I. S., DORONIN, S. V. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, v. 25, p. 1761-1768, 2007.

POURRAJAB, F., FOROUZANNIA, S., TABATABAEE, S. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. *International Journal of Cardiology*, v. 163, p. 125-131, 2013.

PREZIOSI, L., AMBROSI, D., VERDIER, C. An elasto-visco-plastic model of cell aggregates. *Journal of Theoretical Biology*, v. 262, p. 35-47, 2010.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, v. 276, p. 71-74, 1997.

PRZEKORA, A. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Bio. Appl.*, v. 97, p. 1036-1051, 2019.

PRZEKORA, A. Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, 2019.

PUCHTLER, H., MELOAN, S., TERRY, M. On the history and mechanism of Alizarin and Alizarin red S stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 17, p. 110-124, 1968.

QIN, Y., WANG, L., GAO, Z., CHEN, G., ZHANG, C. Bone marrow stromal/stem cell-derived extracellular vesicles regulate osteoblast activity and differentiation in vitro and promote bone regeneration in vivo. *Scientific Reports*, v. 6, p. 1-11, 2016.

RAGO, P., DEAN, M.D., MORGAN, J.R. Controlling cell position in complex heterotypic 3D microtissues by tissue fusion. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, 2009.

RANGA, A., GJOREVSKI, N., LUTOLF, M. Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 69-70, p. 19-28, 2014.

RAO, L. V., RAPAPORT, S. I., LORENZI, M. Enhancement by human umbilical vein endothelial cells of factor Xa-catalyzed activation of factor VII. *Blood*, v. 71, p. 791-796, 1988.

RAVICHANDRAN, A., LIU, Y., TEOH, S-H. Review: bioreactor design towards generation of relevant engineered tissues: focus on clinical translation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 12, p. 7-22, 2018.

REDONDO-CASTRO, E., CUNNINGHAM, C., MILLER, J., MARTUSCELLI, L., AOULAD-ALI, S., ROTHWELL, N. J., KIELTY, C. M., ALLAN, S. M., PINTEAUX, E. Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Res. Therapy*, v. 1, p. 1-11, 2018.

RESENDE, R. F. B., SARTORETTO, S. C., UZEDA, M. J., ALVES, A. T. N. N., CALASANS-MAIA, J. A., ROSSI, A. M., GRANJEIRO, J. M. CALASANS-MAIA, M. D. Randomized controlled clinical trial of nanostructured carbonated hydroxyapatite for alveolar bone repair. *Materials*, v. 12, p. 3645, 2019.

REZENDE, R. A., PEREIRAA, F.D.A.S., KASYANOV, V., KEMMOKU, D.T., MAIA, I., DA SILVA, J.V.L., MIRONOV, V. Scalable biofabrication of tissue spheroids for organ printing. *The First CIRP Conference on Biomanufacturing*, v. 5, p. 276-281, 2013.

RICHARDSON, S., KALAMEGAM, G., PUSHPARAJ, P., MATTA, C., MEMIC, A., KHADEMHOSEINI, A., MOBASHERI, R., POLETTI, F., HOYLAND, J., MOBASHERI, A. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods*, v. 99, p. 69-80, 2016.

RICHARDS, D., JIA, J., YOST, M., MARKWALD, R., MEI, Y. 3D bioprinting for vascularized tissue fabrication. *Annals of biomedical engineering*, v. 45, p. 132–147, 2017.

RISAU, W. Vasculogenesis, angiogenesis and endothelial cell differentiation during embryonic development. In: Feinberg RN, Sherer GK, Auerbach R (eds) *The Development of the Vascular System. Issues Biomed*, Karger, Basel v. 14, p. 58–68, 1991.

RISAU, W., FLAMME, I. Vasculogenesis. *Annu. Ver. Cell Dev. Biology*, v. 11, p. 73–91, 1995.

ROBINSON, E. E., FOTY, R. A., CORBETT, S. A. Fibronectin matrix assembly regulates $\alpha 5 \beta 1$ -mediated cell cohesion. *Mol. Biol. Cell*, v. 15, p. 973–981, 2004.

ROBU, A., MIRONOV, V., NEAGU, A. Using sacrificial cell spheroids for the bioprinting of perfusable 3D tissue and organ constructs: a computational study. *Comput. Math. Methods in Medicine*, v. 2019, p. 1-9, 2019.

RODDY, E., DEBAUN, M., DAOUD-GRAY, A., YANG, Y., GARDNER, M. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur. J. Orthop Surg. Traumatology*, v. 28, p. 351-362, 2018.

ROGERS, M., SOBOLIK, T., SCHAFFER, D., SAMSON, P., JOHNSON, A., OWENS, P., CODREANU, S., SHERROD, S., MCLEAN, J., WIKSWO, J., RICHMOND, A.

Engineered microfluidic bioreactor for examining the three-dimensional breast tumor microenvironment. *Biomicrofluidics*, v. 12, p. 1-12, 2018.

ROUX, B. M., AKAR, B., ZHOU, W., STOJKOVA, K., BARRERA, B., BRANKOV, J., BREY, E. Preformed vascular networks survive and enhance vascularization in critical sized cranial defects. *Tissue Engineering Part A*, v. 24, p. 1603-1615, 2018.

ROUWKEMA, J., BOER, J., VAN BLITTERSWIJK, C. A. Endothelial Cells Assemble into a 3-Dimensional Prevascular Network in a Bone Tissue Engineering Construct. *Tissue Engineering*, v. 12, p. 2685-2693, 2006.

ROUWKEMA, J., RIVRON, N., VAN BLITTERSWIJK, C. Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, v. 8, p. 434-441, 2008.

RYU, N-E.; LEE, S-H; PARK, H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, v. 8, p. 1620, 2019.

SAITO, T., FUKAI, A., MABUCHI, A., IKEDA, T., YANO, F., OHBA, S., NISHIDA, N., AKUNE, T., YOSHIMURA, N., NAKAGAWA, T., NAKAMURA, K., TOKUNAGA, K., CHUNG, U., KAWAGUCHI, H. Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat. Medicine*, v. 16, p. 678-689, 2010.

SANTOS, M., UNGER, R., SOUSA, R., REIS, R., KIRKPATRICK, C. Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone-starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials*, v. 30, p. 4407-4415, 2009.

SATO, T. N., TOZAWA, Y., DEUTSCH, U., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., FUJIWARA, Y., GENDRON-MAGUIRE, M., GRIDLEY, T., WOLBURG, H., RISAU, W., QUIN, Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases TIE1 and TIE2 in blood vessel formation. *Nature*, v. 376, p. 70-74, 1995.

SANO, K., USUI, M., MORITANI, Y., NAKAZAWA, K., HANATANI, T., KONDO, H., NAKATOMI, M., ONIZUKA, S., IWATA, T., SATO, T., TOGARI, A., ARIYOSHI, W., NISHIHARA, T., NAKASHIMA, K. Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration. *Regenerative Therapy*, v. 14, p. 59-71, 2020.

SCHIFF, M. H. Role of interleukin 1 and interleukin 1 receptor antagonist in the mediation of rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, v. 59, p. 103-108, 2000.

SCHERBERICH, A., MÜLLER, A. M., SCHÄFER, D. J., BANFI, A., MARTIN, I. Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *Journal of Cellular Physiology*, v. 225, p. 348-353, 2010.

SCHERZED, A., HACKENBERG, S., FROELICH, K., RAK, K., SCHENDZIELORZ, P., GEHRKE, T., HAGEN, R., KLEINSASSER, N. The differentiation of hMSCs counteracts their migration capability and pro-angiogenic effects in vitro. *Oncology Reports*, v. 35, p. 219-226, 2016.

SCOTCHFORD, C.A., GILMORE, C.P., COOPER, E., LEGGETT, G.J., DOWNES, S. Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *J. Biomed. Mater. Res.*, v. 59, p. 84-99, 2002.

SERBO, J. V., GERECHT, S. Vascular tissue engineering: biodegradable scaffold platforms to promote angiogenesis. *Stem Cell Research Translational*, v. 4, p. 1-8, 2013.

SHAH, S., LEE, H., PARK, Y.H., JEON, E., CHUNG, H.K., LEE, E.S., SHIM, J.H., KANG, K.T. Three-dimensional angiogenesis assay system using co-culture spheroids formed by endothelial colony forming cells and mesenchymal stem cells. *J. Vis. Experiments*, v. 151, p. 1-12, 2019.

SHAFIQ, M., JUNG, Y., KIM, S.H. Insight on stem cell preconditioning and instructive biomaterials to enhance cell adhesion, retention, and engraftment for tissue repair. *Biomaterials*, v. 90, p. 85-115, 2016.

SHARIFI, F., FIROOZABADI, B., FIROOZBAKHS, K. Numerical investigations of hepatic spheroids metabolic reactions in a perfusion bioreactor. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 1-17, 2019.

SHEN, G. The role of type X collagen in facilitating and regulating endochondral ossification of articular cartilage. *Orthod. Craniofacial*, v. 8, p. 11-17, 2005.

SHI, R., HUANG, Y., MA, C., WU, C., TIAN, W. Current advances for bone regeneration based on tissue engineering strategies. *Frontiers of Medicine*, v. 13, p. 160-188, 2019.

SILVA, K. R., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J. C., CLAUDIO-DA-SILVA, C., MAYA-MONTEIRO, C-M., BOROJEVIC, R., BAPTISTA, L. S. Stromal-vascular fraction content and adipose stem cell behavior are altered in morbid obese and post bariatric surgery ex-obese women. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 6, p. 1-13, 2015.

SILVA, K. R., REZENDE, R. A., PEREIRA, F. D. A. S., GRUBER, P., STUART, M. P., OVSIANIKOV, A., BRAKKE, K., KASYANOV, V., DA SILVA, J., GRANJEIRO, J-M., BAPTISTA, L-S., MIRONOV, V. Delivery of human adipose stem cells spheroids into lockyballs. *PLOS One*, v. 11, p. 1-14, 2016.

SILVA, K. R., CÔRTEZ, I., LIECHOCKI, S., CARNEIRO, J. R. I., SOUZA, A. A. P., BOROJEVIC, R., MAYA-MONTEIRO, C. M., BAPTISTA, L. S. Characterization of stromal vascular fraction and adipose stem cells from subcutaneous, preperitoneal and visceral morbidly obese human adipose tissue depots. *Plos One*, v. 12, p. 1-15, 2017.

SIVARAJ, K., ADAMS, R. Blood vessel formation and function in bone. *Development*, v. 15, p. 2706-2715, 2016.

SKYLAR-SCOTT, M., UZEL, S., NAM, L., AHRENS, J., TRUBY, R., DAMARAJU, R., LEWIS, J. Biomanufacturing of organ-specific tissues with high cellular density and embedded vascular channels. *Science Advances*, v. 5, p. 1-13, 2019.

SONG, R., MURPHY, M., LI, C., TING, K., SOO, C., ZHENG, Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p. 3117-3145, 2018.

SPRANDIO, J. D., SHAPIRO, S. S., THIAGARAJAN, P., MCCORD, S. Cultured human umbilical vein endothelial cells contain a membrane glycoprotein immunologically related to platelet glycoprotein Ib. *Blood*, v. 71, p. 234-237, 1988.

STRATTON, S., SHELKE, N. B., HOSHINO, K., RUDRAIAH, S., KUMBAR, S. G. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, v. 1, p. 93-108, 2016.

SUENAGA, H., FURUKAWA, K., SUZUKI, Y., TAKATO, T., USHIDA, T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, p. 1-9, 2015.

SURI, C., JONES, P. F., PATAN, S., BARTUNKOVA, S., MAISONPIERRE, P. C., DAVIS, S., SATO, T. N., YANCOPOULOS, G. O. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor during embryonic angiogenesis. *Cell*, v. 87, p. 1171-1180, 1996.

SUSIENKA, M.J., WILKS, B.T., MORGAN, J.R. Quantifying the kinetics and morphological changes of the fusion of spheroid building blocks. *Biofabrication*, v. 8, 2016.

SWAMINATHAN, S., HAMID, Q., SUN, W., CLYNE, A. Bioprinting of 3D breast epithelial spheroids for human cancer models. *Biofabrication*, v. 11, p. 1-18, 2020.

TAKAYANAGI, H., SATO, K., TAKAOKA, A., TANIGUCHI, T. Interplay between interferon and other cytokinesystems in bone metabolism. *Immunological Reviews*, v. 208, p. 181-193, 2005.

TAKEHARA, H., SAKAGUCHI, K., SEKINE, H., OKANO, T., SHIMIZU, T. Microfluidic vascular-bed devices for vascularized 3D tissue engineering: tissue engineering on a chip. *Biomedical Microdevices*, v. 22, p. 1-7, 2020.

TANG, W., YANG, F., LI, Y., DE CROMBRUGGHE, B., JIAO, H., XIAO, G., ZHANG, C. Transcriptional regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) in osteoblasts. *J Biol Chemistry*, v. 287, p. 1671-1678, 2012.

TANG, D., TARE, R. S., YANG, L-Y., WILLIAMS, D. F., OU, K-L., OREFFO, R. O. C. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*, v. 83, p. 363-382, 2016.

TANG, M., TIAN, L., LUO, G., YU, X. Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1-14, 2018.

TANIGUCHI, D., MATSUMOTO, K., TSUCHIYA, T., MACHINO, R., TAKEOKA, Y., ELGALAD, A., GUNGE, K., TAKAGI, K., TAURA, Y., HATACHI, G., MATSUO, N., YAMASAKI, N., NAKAYAMA, K., NAGAYASU, T. Scaffold-free trachea regeneration by tissue engineering with bio-3D printing. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, v. 26, p. 745-752, 2018.

TENGOOD, J., KOVACH, K., VESCOVI, P., RUSSELL, A., LITTLE, S. Sequential delivery of vascular endothelial growth factor and sphingosine 1-phosphate for angiogenesis. *Biomaterials*, v. 31, p. 7805–7812, 2010.

THOMAS, D., GASPAR, D., SORUSHANOVA, A., MILCOVICH, G., SPANOUEDES, K., MULLEN, A.M., O'BRIEN, T., PANDIT, A., ZEUGOLIS, D.I. Scaffold and scaffold-free self-assembled systems in regenerative medicine. *Biotechnology and Bioengineering*, v.113, p. 1155-1163, 2016.

THOMPSON, EM., MATSIKO, A., FARRELL, E., KELLY, DJ., O'BRIEN, FJ. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, p. 889-902, 2014.

THIEL, A., REUMANN, M. K., BOSKEY, A., WISCHMANN, J., VON EISENHART-ROTHE, R., MAYER-KUCKUK, P. Osteoblast migration in vertebrate bone. *Biological Reviews*, p. 1-12, 2017.

TOMLINSON, R., SILVA, M. Skeletal blood flow in bone repair and maintenance. *Bone Research*, v. 1, p. 311–322, 2013.

TRAMPER, T., VLAK, J. M. Bioreactor design for growth of shear-sensitive mammalian and insect cells. *Advanced Biotechnological Process*, v. 7, p. 199-228, 1988.

TRUETA, J., MORGAN, J. D. The vascular contribution to osteogenesis. *The Journal of Bone and Joint Surgery: British volume*, v. 42, p. 97-109, 1960.

TRUETA, J., MORGAN, J. D. The vascular contribution to osteogenesis. I: Studies by the injection method. *J. Bone Joint Surg. British Volume*, v. 42-B, p. 97–109, 1960.
TRUETA, J. Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin. Orthop. Relat. Research*, v. 105, p. 11–26, 1974.

TSAI, T-L., NELSON, B., ANDERSON, P., ZDEBLICK, T., LI, W-J. Intervertebral disc and stem cells co-cultured in biomimetic extracellular matrix stimulated by cyclic compression in perfusion bioreactor. *The Spine Journal*, v. 14, p. 2127-2140, 2014.

URCIUOLO, F., IMPARATO, G., TOTARO, A., NETTI, P. A. Building a tissue *in vitro* from the bottom up: implications in regenerative medicine. *Methodist Debaque Cardiovascular Journal*, v. 9, p. 213-217, 2013.

UTAMA, R., ATAPATTU, L., O'MAHONY, A., FIFE, C., BAEK, J., ALLARD, T., O'MAHONY, K., RIBEIRO, J., GAUS, K., KAVALLARIS, M., GOODING, J. A 3D bioprinter specifically designed for the high-throughput production of matrix-embedded multicellular spheroids. *IScience*, v. 23, p. 1-26, 2020.

UTZINGER, U., BAGGETT, B., WEISS, J., HOYING, J., EDGAR, L. Large-scale time series microscopy of neovessel growth during angiogenesis. *Angiogenesis*, v. 18, p. 219-232, 2015.

VALENTI, M.T., DALLE CARBONARE, L., MOTTES, M. Osteogenic differentiation in healthy and pathological conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1-9, 2016.

VERSEIJDEN, F., POSTHUMUS-VAN SLUIJS, S., PAVLJASEVIC, P., HOFER, S., VAN OSCH, G., FARRELL, E. Adult human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells support the formation of prevascular-like structures from endothelial cells in vitro. *Tissue Engineering Part A*, v. 16, p. 101-114, 2010.

VIDAL, L., BRENNAN, Á., KRISSIAN, S., LIMA, J., HOORNAERT, A., ROSSET, P., FELLAH, H., LAYROLLE, P. In situ production of pre-vascularized synthetic bone grafts for regenerating critical-sized defects in rabbits. *Acta Biomaterialia*, v. 114, p. 384-394, 2020.

VIJAYAVENKATARAMAN, S., YAN, W-C., LU, W. F., WANG, C-H., FUH, J. Ying H. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 132, p. 296-332, 2018.

VISCONTI, R.P., KASYANOV, V., GENTILE, C., ZHANG, J., MARKWALD, R.R., MIRONOV, V. Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert opinion on biological therapy*, v.10, p. 409-420, 2010.

WAGNER, E., PARRY, J., DADSETAN, M., BRAVO, D., RIESTER, S., VAN WIJNEN, A., YASZEMSKI, M, KAKAR, S. VEGF-mediated angiogenesis and vascularization of a fumarate-crosslinked polycaprolactone (PCLF) scaffold. *Connective Tissue Research*, v. 6, p. 542-549, 2018.

WANG, J., WANG, Y., WANG, S., CAI, J., SHI, J., SUI, X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell-secreted IL-8 promotes the angiogenesis and growth of colorectal cancer. *Oncotarget*, v. 6, p. 42825-42837, 2015.

WANG, Z., LEE, S., CHENG, H-J., YOO, J., ATALA, A. 3D bioprinted functional and contractile cardiac tissue constructs. *Acta Biomaterialia*, v. 70, p. 48-56, 2018.

WANG, T., GUO, S., ZHANG, H. Synergistic effects of controlled-released BMP-2 and VEGF from nHAC/PLGAs Scaffold on osteogenesis. *BioMed Research International*, v. 2018, p. 1-12, 2018.

WANG, T., HE, C. TNF- α and IL-6: the link between immune and bone system. *Current Drug Targets*, v. 21, p. 213-227, 2020.

WATSON, E., ADAMS, R. Biology of bone: the vasculature of the skeletal system. *Cold Spring Harb Perspect Medicine*, v. 7, p. 1-14, 2018.

WU, D., ISAKSSON, P., FERGUSON, S., PERSSON, C. Young's modulus of trabecular bone at the tissue level: a review. *Acta Biomaterialia*, v. 78, p. 1-12, 2018.

WU, J., ZHENG, A., LIU, Y., JIAO, D., ZENG, D., WANG, X., CAO, L., JIANG, X. Enhanced bone regeneration of the silk fibroin electrospun scaffolds through the modification of the graphene oxide functionalized by BMP-2 peptide. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 733-751, 2019.

YAO, T., WIERINGA, P., CHEN, H., CHANDRAKAR, A., SAMAL, P., GISELBRECHT, S., BAKER, MATTHEW., MORONI, L. Fabrication of a self-assembled honeycomb nanofibrous scaffold to guide endothelial morphogenesis. *Biofabrication*, v. 12, p. 1-26, 2020.

YAMAGUCHI, Y., OHNO, J., SATO, A., KIDO, H., FUKUSHIMA, T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 1-10, 2014.

YAN, Y., SONG, L., MADINYA, J., MA, T., LI, Y. Derivation of cortical spheroids from human induced pluripotent stem cells in a suspension bioreactor. *Tissue Engineering Part A*, v. 24, p. 418-431, 2018.

YANG, X., MIRONOV, V., WANG, Q. Modeling fusion of cellular aggregates in biofabrication using phase field theories. *Journal of theoretical biology*, v. 303, p. 8, 2012.

YANG, Y., LIN, H., SHEN, H., WANG, B., LEI, G., TUAN, R. Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo. *Acta Biomaterialia*, v. 69, p. 71-82, 2018.

YANG, L., LI, X., WU, Y., DU, P., SUN, L., YU, Z., SONG, S., YIN, J., MA, X., JING, C., ZHAO, J., CHEN, H., DONG, Y., ZHANG, Q., ZHAO, L. Preparation of PU/fibrin vascular scaffold with good biomechanical properties and evaluation of its performance in vitro and in vivo. *International Journal of Nanomedicine*, v. 15, p. 8697-8715, 2020.

YANG, Y.; WANG, M.; YANG, S.; LIN, Y.; ZHOU, Q.; LI, H.; TANG, T. Bioprinting of an osteocyte network for biomimetic mineralization. *Biofabrication*, v. 12, p. 1-26, 2020.

YIN, S., ZHANG, W., ZHANG, Z., JIANG, X. Recent advances in scaffold design and material for vascularized tissue-engineered bone regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, v. 10, p. 1-19, 2019.

XU, K., ZHU, C., XIE, J., LI, X., ZHANG, Y., YAO, F., GU, Z., YANG, J. Enhanced vascularization of PCL porous scaffolds through VEGF-Fc modification. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 6, p. 4474-4485, 2018.

XU, Y., HU, Y., LIU, C., YAO, H., LIU, B., MI, S. A novel strategy for creating tissue-engineered biomimetic blood vessels using 3D bioprinting technology. *Materials*, v. 11, p. 1-15, 2018.

XU, M., LI, J., LIU, X., LONG, S., SHEN, Y., LI, Q., REN, L., MA, D. Fabrication of vascularized and scaffold-free bone tissue using endothelial and osteogenic cells differentiated from bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*, v. 61, p. 21-29, 2019.

ZAMBONI, L., PEASE, D. C. The vascular bed of red bone marrow. *J. Ultrastruct. Research*, v. 5, p. 65–85, 1961.

ZEHNDER, T.; BOCCACCINI, A. R.; DETSCH, R. Biofabrication of a co-culture system in an osteoid-like hydrogel matrix. *Biofabrication*, v. 9, p. 1-30, 2017.

ZELZER, E., GLOTZER, D. J., HARTMANN, C., THOMAS, D., FUKAI, N., SOKER, S., OLSEN, B. R. Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires *Cbfa1/Runx2*. *Mech. Development*, v. 106, p. 97-106, 2001.

ZELZER, E., MCLEAN, W., NG, Y. S., FUKAI, N., REGINATO, A. M., LOVEJOY, S., D'AMORE, P. A., OLSEN, B. R. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development*, v. 129, p. 1839-1904, 2002.

ZHANG, X., ZHANG, Y. Tissue engineering applications of three-dimensional bioprinting. *Cell Biochemistry and Biophysics*, [S.L.], v. 72, p. 777-782, 2015.

ZHANG, S., LIU, P., CHEN, L., WANG, Y., WANG, Z., ZHANG, B. The effects of spheroid formation of adipose-derived stem cells in a microgravity bioreactor on stemness properties and therapeutic potential. *Biomaterials*, v. 41, p. 15-25, 2015.

ZHANG, W., WRAY, L., RNJAK-KOVACINA, J., XU, L., ZOU, D., WANG, S., ZHANG, M., DONG, J., LI, G., KAPLAN, D., JIANG, X. Vascularization of hollow channel-modified porous silk scaffolds with endothelial cells for tissue regeneration. *Biomaterials*, v. 56, p. 68-77, 2015.

ZIGDON-GILADI, H., KHUTABA, A., ELIMELECH, R., MACHTEI, E., SROUJI, S. VEGF release from a polymeric nanofiber scaffold for improved angiogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 10, p. 2712-2721, 2017.

ZUBILLAGA, V., ALONSO-VARONA, A., FERNANDES, S., SALABERRIA, A., PALOMARES, T. Adipose-derived mesenchymal stem cell chondro spheroids cultured in hypoxia and a 3D porous chitosan/chitin nanocrystal scaffold as a platform for cartilage tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, p. 1-17, 2020.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, p. 211-228, 2001.

ANEXOS

ANEXO I – FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEP NÚMERO 826/09



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
☒ Alice Helena Dutra Violante
 Médica - Prof. Associada

Secretário:
☒ Jansen Rodrigues de Sá
 Professor

Membros Titulares:
☐ Joana Maria Almeida Faria
 Antropóloga - Prof. Associada
☐ Eliana Regina Ambrósio
 Assistente Social - Mestre
☒ Helena Wladyka
 Representante dos Estudantes
☐ Lucio de Conceição Araújo Marques
 Enfermeiro - Mestre
☐ Maria Antônia Viana Brand
 Médica - Professora Adjunta
☒ Maria Tereza Soares
 Farmacêutica - Especialista
☒ Patrícia Conceição Fernandes
 Médica - Prof. Adjunta
☒ Paulo Fajó Barros
 Médico - Prof. Associado
☐ Roberto Cruz Pinho
 Médico - Doutor
☐ Roberto Takaki Sudo
 Médico - Prof. Titular

Membros Suplentes:
☒ Anna Porto Tindack Rocha Pinheiro
 Nutricionista - Professora Auxiliar
☐ Joana Maria Trigo
 Médica - Doutora
☒ Carlos Alberto Guimarães
 Médico - Prof. Associado
☐ Cristiane de Assis Matos
 Juruêiro
☐ Izabel Maria Lacerda Viana
 Advogada - Mestre
☐ Jéssica Conceição Lopes Marques
 Assistente Social
☒ Maria Regina Christo de Sá
 Enfermeira
☒ Cibele Pereira May de Sousa
 Médica - Prof. Associada
☒ Fabiana Fátima Silva Costa
 Médica - Professora Adjunta
☒ Flávia Maria Viana Rodrigues Almeida
 Farmacêutica - Professora Adjunta
☒ Maria Tereza Torres Soares
 Representante dos Estudantes
☐ Thaíssa
 Médica - Prof. Adjunta

CEP - MEMO – n.º 826/09 Rio de Janeiro, 08 de outubro de 2009.

De: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Dra. Leandra Santos Baptista

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 029 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 145/09 - CEP

Título: "Isolamento e caracterização de células derivadas de tecido adiposo e da pele de pacientes com índice de massa corporal normal e ex-obesos visando o seu uso em protocolos de terapia celular e engenharia tecidual"

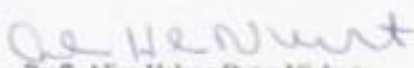
Pesquisador (a) responsável: Dra. Leandra Santos Baptista

Data de apreciação do parecer: 05/10/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. S.a. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 05/04/2010, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d, da Resolução n.º 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,


 Profª. Alice Helena Dutra Violante
 Coordenadora do CEP

ANEXOS

ANEXO II – FOLHA DE APROVAÇÃO DO CEUA NÚMERO 1474030618



Universidade
Federal
Fluminense

ceua
Comitê de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DE TECNOLOGIA PARA BIOIMPRESSÃO 3D PARA OSSO AUTÓGENO ENGENHEIRADO (VERSAO 2)", protocolada sob o CEUA nº 1474030618, sob a responsabilidade de **Monica Diuana Calasans Maia** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 13/07/2018.

We certify that the proposal "3D ASSESSMENT FOR 3D BIOIMPRESSION FOR AUTOGENOUS BONE ENGINEERED (VERSION 2)", utilizing 90 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 1474030618, under the responsibility of **Monica Diuana Calasans Maia** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 07/13/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [08/2018](#) a [01/2019](#) Área: [Odontologia](#)

Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [9 a 11 semanas](#)

N: [90](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [300 a 400 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Experimentação Animal

Niterói, 13 de julho de 2018

Profa. Dra. Mônica Diuana Calasans Maia
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Fabio Otero Ascoli
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

ANEXOS

ANEXO III - Artigo científico publicado 1: KRONEMBERGER *et al.*, 2020.

Article type : Main Text

Scaffold- and Serum-Free Hypertrophic Cartilage Tissue Engineering as an Alternative Approach for Bone Repair

Gabriela S. Kronemberger^{1,2,3}, Gisele M.L. Dalmônico⁴, André L. Rossi⁴, Paulo Emílio Correa Leite^{2,5}, Antonio M. Saraiva⁶, Anderson Beatrici^{5,7}, Karina Ribeiro Silva^{2,5}, José Mauro Granjeiro^{2,3,5,8*} and Leandra Santos Baptista^{1,2,3,5*}

¹Nucleus of Multidisciplinary Research in Biology (Numpex-Bio), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Campus of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory of Tissue Bioengineering, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

³Post-graduation Program of Translational Biomedicine (Biotrans), Unigranrio, Campus I, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Brazilian Center for Physics Research, Xavier Sigaud 150, Urca, RJ, Brazil

⁵Post-graduation Program in Biotechnology, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Laboratory of Macromolecules, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil

⁷Scientific and Technological Metrology Division (Dimci), National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, 25250-020, Rio de Janeiro, Brazil

⁸Laboratory of Clinical Research in Odontology, Fluminense Federal University (UFF), Niterói, Brazil

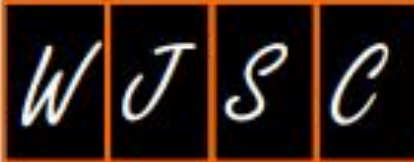
*Corresponding authors:

Leandra Santos Baptista, Ph.D

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/AOR.13637](https://doi.org/10.1111/AOR.13637)

ANEXOS

ANEXO IV - Artigo científico publicado 2: KRONENBERGER et al., 2020.



World Journal of Stem Cells

Submit a Manuscript: <https://www.wjgnet.com>

DOI: 10.4252/wjsc.122.2.110

World J Stem Cells 2020; February 26; 12(2): 110-122

ISSN 1948-0210 (online)

ISSN 1948-0210 (print)

Cartilage and bone tissue engineering using adipose stromal/stem cells spheroids as building blocks

Gabriela S Kronemberger, Renata Akemi Morais Matsui, Guilherme de Almeida Santos de Castro e Miranda, José Mauro Granjeiro, Leandra Santos Baptista

ORCID number: Gabriela S Kronemberger ([0000-0002-0951-2211](https://orcid.org/0000-0002-0951-2211)); Renata Akemi Morais Matsui ([0000-0003-4200-8175](https://orcid.org/0000-0003-4200-8175)); Guilherme de Almeida Santos de Castro e Miranda ([0000-0002-6690-1342](https://orcid.org/0000-0002-6690-1342)); José Mauro Granjeiro ([0000-0002-8827-4291](https://orcid.org/0000-0002-8827-4291)); Leandra Santos Baptista ([0000-0001-8996-8044](https://orcid.org/0000-0001-8996-8044)).

Author contributions: Kronemberger GS drafted the article, contributed to the conception and design of the manuscript and wrote the article. Matsui RAM drafted and wrote the article. Miranda GASC drafted and wrote the article. Granjeiro JM contributed to the writing of the manuscript, made critical revisions related to relevant intellectual content of the manuscript and approved the final version of the article. Baptista LS drafted the article, contributed to the conception and design of the manuscript, contributed to the writing of the manuscript, made critical revisions related to relevant intellectual content of the manuscript and approved the final version of the article.

Supported by: the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), No. 88802.366181/2019-01; the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), No. E-26/202.680/2018; National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), No. 467513/2014-7.

Gabriela S Kronemberger, Renata Akemi Morais Matsui, Guilherme de Almeida Santos de Castro e Miranda, José Mauro Granjeiro, Leandra Santos Baptista, Laboratory of Tissue Bioengineering, Directory of Metrology Applied to Life Sciences, National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil

Gabriela S Kronemberger, Leandra Santos Baptista, Post-graduate Program in Translational Biomedicine (Biotrans), Unigranrio, Campus I, Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil

Renata Akemi Morais Matsui, José Mauro Granjeiro, Leandra Santos Baptista, Post-graduate Program in Biotechnology, National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil

Guilherme de Almeida Santos de Castro e Miranda, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Duque de Caxias, Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil

José Mauro Granjeiro, Laboratory of Clinical Research in Odontology, Fluminense Federal University (UFF), Niterói 25255-030 Brazil

Leandra Santos Baptista, Multidisciplinary Center for Biological Research (Nampes-Bio), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) Campus Duque de Caxias, Duque de Caxias, RJ 25245-590, Brazil

Corresponding author: Leandra Santos Baptista, PhD, Associate Professor, Laboratory of Tissue Bioengineering, Directory of Metrology Applied to Life Sciences, National Institute of Metrology, Quality and Technology (INMETRO), Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil. leandrabaptista@nampes.ufrj.br

Abstract

Scaffold-free techniques in the developmental tissue engineering area are designed to mimic *in vivo* embryonic processes with the aim of biofabricating, *in vitro*, tissues with more authentic properties. Cell clusters called spheroids are the basis for scaffold-free tissue engineering. In this review, we explore the use of spheroids from adult mesenchymal stem/stromal cells as a model in the developmental engineering area in order to mimic the developmental stages of cartilage and bone tissues. Spheroids from adult mesenchymal stromal/stem cells lineages recapitulate crucial events in bone and cartilage formation during embryogenesis, and are capable of spontaneously fusing to other spheroids, making them ideal building blocks for bone and cartilage tissue engineering. Here, we discuss data from ours and other labs on the use of adipose stromal/stem cell spheroids in chondrogenesis and osteogenesis *in vitro*. Overall,

 WJSC | <https://www.wjgnet.com>

110

February 26, 2020 | Volume 12 | Issue 2 |

ANEXOS

ANEXO V - Artigo científico publicado 3: KRONEMBERGER *et al.*, 2020.

Article type : Review Article

Spheroids and organoids as humanized 3D scaffold-free engineered tissues for SARS-CoV-2 viral infection and drug screening

Gabriela S. Kronemberger^{1,2}, Fabiana A. Carneiro¹, Danielle F. Rezende³ and Leandra S. Baptista^{1,2*}

¹Nucleus of Multidisciplinary Research in Biology (Numpex-Bio), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

²Postgraduation Program of Translational Biomedicine (Biotrans), Unigranrio, Campus I, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

³gcell 3D cell culture, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Running head: Spheroids and organoids for SARS-CoV-2 infection

Correspondence author:

Leandra Santos Baptista, Nucleus of Multidisciplinary Research in Biology (Numpex-Bio), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Campus of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil.

Email: leandra.baptista@gmail.com

Received: September 24, 2020

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/AOR.13880](#)

This article is protected by copyright. All rights reserved

ANEXO VI - Artigo científico publicado 4: PALHARES, NP., DE MENEZES, LR., KRONEMBERGER, GS. *et al.*, 2021.

3D Printing and Additive Manufacturing, Vol. 8, No. 4 | Original Articles

Production and Characterization of Poly (Lactic Acid)/Nanostructured Carboapatite for 3D Printing of Bioactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Thiago Nunes Palhares, Livia Rodrigues de Menezes, Gabriela Soares Kronemberger, Priscila Giron de Miranda Borchio, Leandra Santos Baptista, Leonardo da Cunha Boldrini Pereira, and Emerson Oliveira da Silva

Published Online: 4 Aug 2021 | <https://doi.org/10.1089/3dp.2020.0211>

 [View Article](#)

Abstract

Biocompatible scaffolds are porous matrices that are bone substitutes with great potential in tissue regeneration. For this, these scaffolds need to have bioactivity and biodegradability. From this perspective, 3D printing presents itself as one of the techniques with the greatest potential for scaffold manufacturing with porosity and established structure, based on 3D digital modeling. Thus, the objective of the present work was to produce 3D scaffolds from the poly (lactic acid) (PLA) and the nanostructured hydroxyapatite doped with carbonate ions (CHA). For this purpose, filaments were produced via fusion for the fused-filament 3D printing and used to produce scaffolds with 50% porosity in the cubic shape and 0/90° configuration. The dispersive energy spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis demonstrated the presence of CHA in the polymeric matrix, confirming the presence and incorporation into the composite. The thermogravimetric analysis made it possible to determine that the filler concentration incorporated in the matrix was very similar to the proposed percentage, indicating that there were no major losses in the process of obtaining the filaments. It can be assumed that the influence of CHA as a filler presents better mechanical properties up to a certain amount. The biological results point to a great potential for the application of PLA/CHA scaffolds in bone tissue engineering with effective cell adhesion, proliferation, biocompatibility, and no cytotoxicity effects.

ANEXO VII - Artigo científico publicado 5: KRONEMBERGER *et al.*, 2021.

Recapitulating Tumorigenesis *in vitro*: Opportunities and Challenges of 3D Bioprinting

Gabriela S. Kronemberger^{1,2,3}, Guilherme A. S. C. Miranda^{1,2,4}, Renata S. N. Tavares², Bianca Montenegro^{1,2,3}, Úrsula de A. Kopke^{1,2} and Leandra S. Baptista^{1,2,3,4*}

¹ Nucleus of Multidisciplinary Research in Biology (Numpax-Bio), Federal University of Rio de Janeiro Xerém, Duque de Caxias, Brazil; ² Laboratory of Tissue Bioengineering, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Brazil; ³ Post-graduation Program of Translational Biomedicine (Biotrans), Unigranrio, Duque de Caxias, Brazil; ⁴ Post-graduation Program in Biotechnology, National Institute of Metrology, Quality and Technology (Inmetro), Duque de Caxias, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ângela Sousa,
University of Beira Interior, Portugal

Reviewed by:

Hilary Ann Kenny,
University of Chicago, United States
Kevin Osofo,
University of Cape Town, South Africa

*Correspondence:

Leandra S. Baptista
leandrabaptista@xerem.uff.br

Specialty section:

This article was submitted to
Nanobiotechnology,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 18 March 2021

Accepted: 29 April 2021

Published: 22 June 2021

Citation:

Kronemberger GS,
Miranda GASC, Tavares RSN,
Montenegro B, Kopke UA and
Baptista LS (2021) Recapitulating
Tumorigenesis *in vitro*: Opportunities
and Challenges of 3D Bioprinting.
Front. Bioeng. Biotechnol. 9:682498.
doi: 10.3389/fbio.2021.682498

Cancer is considered one of the most predominant diseases in the world and one of the principal causes of mortality per year. The cellular and molecular mechanisms involved in the development and establishment of solid tumors can be defined as tumorigenesis. Recent technological advances in the 3D cell culture field have enabled the recapitulation of tumorigenesis *in vitro*, including the complexity of stromal microenvironment. The establishment of these 3D solid tumor models has a crucial role in personalized medicine and drug discovery. Recently, spheroids and organoids are being largely explored as 3D solid tumor models for recreating tumorigenesis *in vitro*. In spheroids, the solid tumor can be recreated from cancer cells, cancer stem cells, stromal and immune cell lineages. Organoids must be derived from tumor biopsies, including cancer and cancer stem cells. Both models are considered as a suitable model for drug assessment and high-throughput screening. The main advantages of 3D bioprinting are its ability to engineer complex and controllable 3D tissue models in a higher resolution. Although 3D bioprinting represents a promising technology, main challenges need to be addressed to improve the results in cancer research. The aim of this review is to explore (1) the principal cell components and extracellular matrix composition of solid tumor microenvironment; (2) the recapitulation of tumorigenesis *in vitro* using spheroids and organoids as 3D culture models; and (3) the opportunities, challenges, and applications of 3D bioprinting in this area.

Keywords: tumor microenvironment, tumorigenesis, 3D cell culture, spheroids, organoids, drug assessment, high-throughput screening, 3D bioprinting

INTRODUCTION

Cancer remains one of the most predominant diseases in the world in the 21st century, affecting millions of patients per year (Roy and Saikia, 2016). Rather than responding appropriately to signals that maintain cell behavior, cancer cells grow and proliferate without control, invading normal tissues and organs, and eventually spreading throughout the organism (Chambers et al., 2002).

ANEXO VIII - Artigo científico publicado 6: KRONEMBERGER *et al.*, 2021.

Artificial Organs / Early View

MAIN TEXT ARTICLE

The hypertrophic cartilage induction influences the building-block capacity of human adipose stem/stromal cell spheroids for biofabricationGabriela S. KronembergerAnderson BeatriciGisele M. L. DalmônicoAndré L. Rossi
Guilherme A. S. C. MirandaLeonardo C. BoldriniJosé Mauro Granjeiro  ... See all authors First published: 26 May 2021
<https://doi.org/10.1111/aor.14000>

Gabriela S. Kronemberger and Anderson Beatrici are contributed equally to this work.

Abstract

As an alternative to the classical tissue engineering approach, bottom-up tissue engineering emerges using building blocks in bioassembly technologies. Spheroids can be used as building blocks to reach a highly complex ordered tissue by their fusion (bioassembly), representing the foundation of biofabrication. In this study, we analyzed the biomechanical properties and the fusion capacity of human adipose stem/stromal cell (ASC) we spheroids during an in vitro model of hypertrophic cartilage established by our research group. Hypertrophic induced-ASC spheroids showed a statistically significant higher Young's modulus at weeks 2 ($P < .001$) and 3 ($P < .0005$) compared with non-induced. After fusion, non-induced and induced-ASC spheroids increased the contact area and decreased their pairs' total length. At weeks 3 and 5, induced-ASC spheroids did not fuse completely, and the cells migrate preferentially in the fusion contact region. Alizarin red O staining showed the highest intensity of staining in the fused induced-ASC spheroids at week 5, together with intense staining for collagen type I and osteocalcin. Transmission electron microscopy and element content analysis (X-ray Energy Dispersive Spectroscopy) revealed in the fused quartet at week 3 a crystal-like structure. Hypertrophic induction interferes with the intrinsic capacity of spheroids to fuse. The measurements of contact between spheroids during the fusion process, together with the change in viscoelastic profile to the plastic, will impact the establishment of bioassembly protocols using hypertrophic induced-ASC spheroids as building blocks in biofabrication.