



Proliferação e diferenciação de osteoblastos associados com microalgas, utilizando bioimpressão 3D com polímeros

Palavras-Chave: microalgas, osteoblastos, bioimpressão 3D

Autores(as):

Guilherme Henrique Aguiar de Queiroz, FCA – UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). LAIS PELLIZZER GABRIEL (orientador(a)), FCA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O processo de ossificação se inicia quando artérias começam a penetrar no pericôndrio e avançam dentro da cartilagem calcificada, pois esse processo estimula as células osteoprogenitoras no pericôndrio a se diferenciarem em osteoblastos, assim mudando a nomenclatura do pericôndrio em periósteo. Com o surgimento de capilares na matriz calcificada próximas aos periósteos, inicia a troca de tecido cartilaginoso por tecido ósseo depositado pelos osteoblastos, criando os centros de ossificação primários, os quais se espalham para realizar a ossificação em direção às extremidades (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

Para suprir essa demanda de oxigênio, surgiu a ideia de realizar a bioimpressão de células osteoblastos juntamente com microalgas, pois são capazes de realizar fotossíntese e liberar O₂ no meio. Maharjan *et al.* (2021) fez um estudo envolvendo o crescimento de células cancerígenas do fígado, hepatomas, (HepG2) junto com microalgas. Nesse estudo, foi mostrado que os scaffolds de HepG2 que estavam em contato com as microalgas ficaram mais viáveis e com maior densidade celular, provando que a oxigenação dada pelas algas no período que permaneceram em contato foi suficiente para a proliferação e sobrevivência das células hepatomas.

METODOLOGIA:

Bioimpressão

Para a bioimpressão de ambas as células, foi utilizado a Allevi 2 (Allevi) e o programa *Repetier* para desenvolver os *G-codes* usados para a impressão.

Bioimpressão das microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*

Para a impressão e imobilização das microalgas, foi utilizado como biotinta (Bioink) o hidrogel alginato, o qual foi produzido utilizando os parâmetros usados por THAKARE et al., 2021. Os parâmetros utilizados para a impressão das microalgas com o alginato foram: altura da camada de 3mm, velocidade da impressão de 700mm/s e pressão de 35psi. Nos *scaffolds* impressos com as microalgas, o número de células utilizadas foi 5×10^6 células/ml. Após o crosslinking, o constructo era mantido em meio tris-acetato-fosfato (TAP) junto com meio Mínimo Essencial modificado (Alpha-MEM) na proporção 1:1 e mantido na estufa em 37°C e 5% de CO₂.

Bioimpressão das células MC3T3-E1

Para a impressão das células pré osteoblastos MC3T3-E1, foi utilizado como biotinta (Bioink) o hidrogel gelatina metacrilato (GelMA). Esse hidrogel foi produzido usando PBS como solvente, 10% do volume final de GelMA (Allevi) e 0,5% do volume final de LAP (Allevi). Os parâmetros utilizados para a impressão das células com o GelMA foram: altura da camada de 3mm, velocidade da impressão de 700mm/s e pressão de 10psi. Nos *scaffolds* impressos com a MC3T3-E1, o número de células utilizadas foi 5×10^6 células/ml. A imobilização das células foi feita filtrando o GelMA através de um filtro de seringa e adicionado 10µL de uma mistura contendo 100µL de soro fetal bovino (FBS) e 4µL de antibiótico. Depois, o GelMA e a solução são misturados com as células imersas em meio Alpha-MEM. Após o crosslinking, o constructo era mantido em meio tris-acetato-fosfato (TAP) junto com meio Mínimo Essencial modificado (Alpha-MEM) na proporção 1:1 e mantido na estufa em 37°C e 5% de CO₂.

Crosslinking do alginato

O processo de ligamento químico das moléculas do alginato foi feito através de uma solução de 100mM de CaCl₂. Após a impressão, a solução era despejada sobre o *scaffold* e mantida por 4 minutos e retirada logo em seguida.

Crosslinking do alginato

O processo de ligamento químico das moléculas do GelMA foi feito através da exposição do construto em luz Ultravioleta (UV) na intensidade de 100% por 20 segundos.

Ensaio de MTT

Os *scaffolds* foram expostos aos conservantes foi mensurado por um ensaio usando um sal de tetrazólio amarelo (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio ou MTT). Essa técnica é usada para avaliar a atividade metabólica das células, proliferação e citotoxicidade, utilizando a redução do MTT em cristais de formazam roxos pela atividade

metabólica mitocondrial das células. Depois de 24, 48 e 72 horas após o tratamento, o meio de cultura foi aspirado, e foi adicionado o MTT (0,5mg/ml em PBS) nos constructos e incubadas por 2 horas em atmosfera umidificada contendo 5% CO₂ à 37°C. O MTT foi aspirado e foi adicionado 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para dissolver o MTT. A placa de 12 poços foi colocada no shaker a 2000RPM por 20 minutos. O conteúdo presente nos poços foi transferido para uma placa de 96 poços para realizar a leitura da absorbância. A absorbância foi determinada em 570nm usando um leitor espectrofotômetro de placas multipoços (F5 Microplate Reader, Molecular Probes).

Teste de sobrevivência

O teste de sobrevivência das microalgas celular foi feito em 72 horas, o qual foi semeado 6.10⁶ células em 15 poços. Em 3 poços as microalgas foram cultivadas em meio TAP e nos demais poços com meio TAP/Alpha-MEM na proporção 1:1. A placa foi deixada na estufa por 72 horas a 37°C em com atmosfera de 5% de CO₂.

Esse teste também foi feito com as células MC3T3-E1, no qual foi feito em 72 horas, o qual foi semeado 6.10⁶ células em 3 poços que possuíam meio TAP/Alpha-MEM na proporção 1:1. A placa foi deixada na estufa por 72 horas a 37°C em com atmosfera de 5% de CO₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Bioimpressão dos dois tipos celulares

Nas primeiras tentativas de impressão, houve morte celular relacionada com contagem celular e tempo de impressão. À medida que eram feitas novas impressões, o número de células que sobreviviam ao processo de impressão aumentava, sendo possível visualizá-las no microscópio ótico, demonstrado na imagem ao lado.



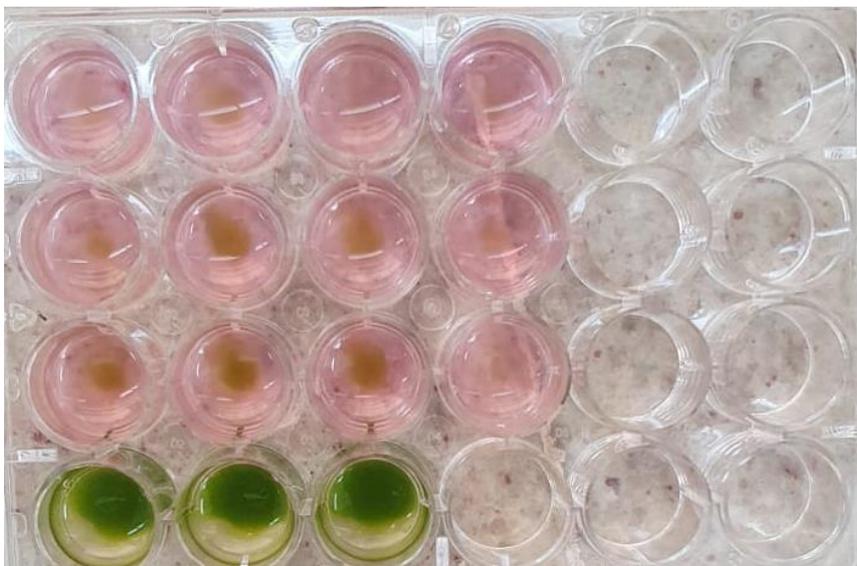
Fonte: Foto autoral 1

Crosslinking dos hidrogéis

O processo de ligação química de ambos os hidrogéis não houve complicação, mantendo a integridade dos materiais após a bioimpressão, mantendo o formato original do scaffold.

Teste de sobrevivência nas microalgas

Nos poços que continham apenas o meio TAP, houve uma grande proliferação celular, causando uma confluência de quase 100% do poço, nos demais poços houve morte celular, como demonstrado na imagem ao lado. A hipótese levantada foi que os antibióticos usados no meio Alpha-MEM poderiam interferir no crescimento celular das algas, e



Fonte: Foto autoral 2

através de artigos científicos, comprovaram que os dois tipos de antibióticos usados no meio interferiam negativamente em 90% na taxa de crescimento (DANI et al., 2022).

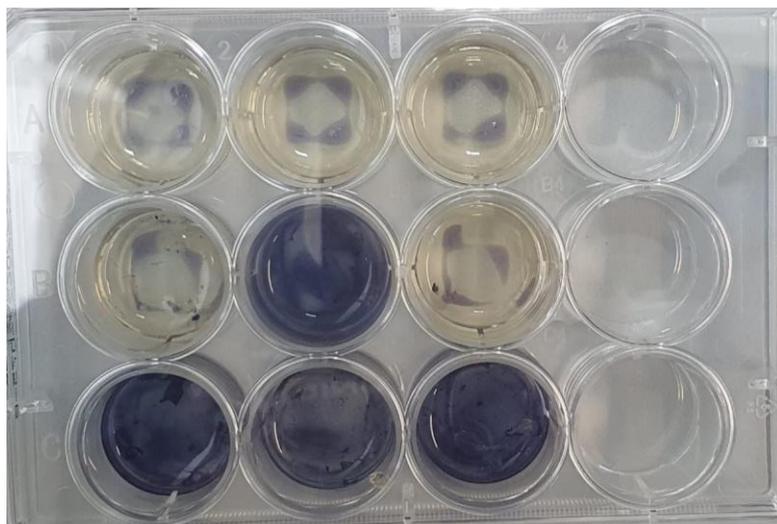
Teste de sobrevivência nas microalgas

O resultado desse teste mostrou que as células animais sofreram uma diminuição na proliferação celular, porém continuaram viáveis e atingiram uma confluência de quase 100% na placa.

Ensaio de MTT

Ao realizar o teste de MTT foi confirmado que as células continuavam metabolicamente ativas após as impressões, como mostrado na imagem ao lado. Porém não foi possível visualizar a diferença entre as células MC3T3-E1 impressas sem e com as microalgas, pois nos

poços que continham as duas células, o resultado de OD obtido na leitura é referente às duas células juntas, com isso não seria possível visualizar se a presença das microalgas causa aumento na proliferação. O teste foi feito em uma placa de 12 poços nos tempos de 48 e 72 horas.



Fonte: Foto autoral 4

Ao realizar esse teste descobrimos outra dificuldade na impressão, caso a impressão e o

crosslinking do GelMA demorarem para serem feitos, o alginato evapora, causando a morte das microalgas, em apenas um poço foi possível realizar os procedimentos no tempo para não afetar as algas.

CONCLUSÕES:

No presente estudo foi concluído que as células utilizadas sobrevivem ao processo de bioimpressão e que são compatíveis com a mistura dos meios, porém é necessário retirar o antibiótico presente no meio Alpha-MEM. Para checar a atuação direta das microalgas com as células de pré osteoblasto é necessário realizar novos testes.

BIBLIOGRAFIA

DANI, S. et al. Selection of a suitable photosynthetically active microalgae strain for the co-cultivation with mammalian cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, n. September, p. 1–16, 2022.

MAHARJAN, S. et al. Symbiotic Photosynthetic Oxygenation within 3D-Bioprinted Vascularized Tissues. *Matter*, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 217–240, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matt.2020.10.022>.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

THAKARE, K. et al. Bioprinting using algae: Effects of extrusion pressure and needle diameter on cell quantity in printed samples. **Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME**, [s. l.], v. 143, n. 1, p. 1–5, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1115/1.4048853>.