

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral

**PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-IL-1 β -
scFab E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE
NANOBIOCOMPÓSITOS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO
TRATAMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE**

Tese

Juiz de Fora

2018

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral

**PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-IL-1 β -
scFab E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE
NANOBIOCOMPÓSITOS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO
TRATAMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Marcelo de Oliveira Santos
Co-orientador: Carlos Magno da Costa Maranduba

Juiz de Fora

2018

Danielle Luciana Aurora Soares do Amaral

**PRODUÇÃO DO ANTICORPO RECOMBINANTE ANTI-IL-1 β -
scFab E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE
NANOBIOCOMPÓSITOS PARA POTENCIAL APLICAÇÃO NO
TRATAMENTO DE ARTRITE REUMATOIDE.**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo de Oliveira Santos
UFJF

Dr. Carlos Magno Maranduba
UFJF

Dra. Jacy Gameiro
UFJF

Dr. Humberto Brandão
Embrapa

Dra. Michele Munk
UFJF

Dra. María Alejandra Alvarez
Universidad de Maimonides

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marcelo pela orientação científica e profissional e pela amizade.

Ao professor Dr. Carlos pela co-orientação,

A professora Dra. Michele Munk por todo apoio, ensinamento e dedicação.

Ao professor Dr. Lyderson por abrir as portas do Laboratório de Genética e Biotecnologia para mim.

Ao professor Dr. José Marcello pela sempre boa vontade em ajudar.

Ao professor Dr. Saulo por toda ajuda e boa vontade.

A Dra. Jacy pela colaboração.

Aos Doutores Priscila Faria, Eveline, Gilson, Raul (*in memoriam*), por esclarecer minhas dúvidas sempre que necessário.

Ao professor Dr. Jair Kopke, pela colaboração na caracterização química do hidrogel de ECM.

Ao professor Dr. Breno Valentim Nogueira, pela realização das imagens de MEV dos hidrogéis.

A Dra. Camila Almeida, pela colaboração na caracterização das nanopartículas e dos hidrogéis.

Ao professor Dr. Luiz Fernando Cappa de Oliveira pela colaboração na caracterização das nanopartículas e dos hidrogéis.

Ao professor Dr. Rafael Macomini, pela colaboração na caracterização mecânica dos hidrogéis.

A professora Dra. Flávia de Paoli, pela colaboração na caracterização mecânica do hidrogel de ECM.

Ao Professor Dr. Roberto Junio, pelas palavras de incentivo ainda no 1º período da graduação.

Ao Dr. Humberto Brandão, pelo suporte ao desenvolvimento do trabalho.

A Dra. Maria Alejandra Alvarez pelo apoio ao desenvolvimento do trabalho e participação na banca avaliadora.

Ao Dr. Leonardo Quellis, companheiro de mestrado e doutorado, por compartilhar comigo todos os sofrimentos e alegrias.

Ao meu pai por ter me dado todo apoio necessário as minhas vitórias e conquistas.

A minha mãe pelos anos de dedicação.

Ao meu irmão pelos momentos de companheirismo e também pelos momentos de brigas e discussões.

Ao Vitor, amigo e companheiro de todas as horas, por me acalmar nos momentos de desespero. Sem seu apoio eu não teria chegado até aqui.

Aos meus avós paternos, Zélia e Vitorino, e maternos, Carmelina e Manoel, por todo amor.

Aos meus amigos de todas as horas Erick, Juliana, Bárbara, Rafael, Daniel e Lilian por todas as pelas risadas, momentos felizes e apoio nos momentos tristes.

A Rafaella Zanette, por toda amizade e ajuda.

A Natália dos Anjos, por tudo que me ensinou, principalmente a perseverar.

A Sirlei, pela amizade e conversas no laboratório.

Ao Vinícius Carius, pela contribuição com o trabalho.

Aos colegas do laboratório pela paciência em dividir o espaço tão disputado e pela convivência.

A minha família por torcerem por mim e compreenderem minhas ausências.

Aos meus amados Mel e Costelinha, por saberem ouvir e confortar mesmo sem saberem dizer uma palavra.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e a rede de pesquisa Agranano.

Na certeza de que ninguém se faz sozinho, obrigada!

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) crônica é uma doença autoimune, caracterizada por inflamação nas articulações, destruição óssea e de cartilagem. As citocinas, importantes reguladores da resposta imune e inflamatória, e a interleucina-1 β promovem inflamação e destruição do tecido sinovial, osso, cartilagem e articulações em pacientes com AR. A utilização de anticorpos anti-interleucinas envolvidas no desencadeamento do processo inflamatório da AR já é realizada, no entanto, essa não é a primeira escolha devido, principalmente, ao alto custo dos medicamentos. Hidrogéis baseados tanto em polímeros sintéticos como naturais vêm sendo desenvolvidos a fim de prover uma liberação duradoura e sítio-específica de anticorpos, diminuindo os riscos da ingestão de doses altas dos medicamentos e o incômodo no caso de sucessivas aplicações. O objetivo deste trabalho foi expressar, em planta, o anticorpo recombinante anti-IL-1 β -scFab, produzir e avaliar a biocompatibilidade de nanobiocompositos para aplicação no tratamento da artrite reumatoide. O anticorpo recombinante anti-IL-1 β -scFab foi expresso com sucesso, sendo capaz de reconhecer o antígeno IL- β no ensaio de ELISA. A biocompatibilidade de NP TB com MSCs da polpa dentária humana foi avaliada. As NP TB não alteraram a proliferação celular, não aumentaram o estresse oxidativo e nem alteraram a morfologia das MSCs, mostrando boa compatibilidade. Foram produzidos hidrogéis de alginato e ECM óssea bovina, suplementados com NP TB. O Hidrogel de alginato e alginato com NP TB foi biocompatível com células-tronco da polpa dentária humana. A adição de NP TB não alterou a proliferação celular nem aumentou o estresse oxidativo. O hidrogel com NP TB apresentou maior porosidade e viscosidade e pH mais próximo ao fisiológico, o que pode favorecer o crescimento celular. Ao adicionarem-se NP TB ao hidrogel de alginato houve aumento da expressão de genes marcadores de diferenciação osteogênica, *ALP*, *BMP-2* e *BMP-4*, avaliado por RT-qPCR. O hidrogel de ECM e ECM com NP TB, mostrou-se também biocompatível. A adição de NP TB não diminuiu a proliferação celular. Além disso, tanto a ECM pura quanto a ECM com NP TB levaram à formação de nódulos ósseos e ao aumento da expressão de ALP. Os resultados demonstraram que o cultivo de células-tronco da polpa dentária humana nos nanobiocompósitos foi capaz de promover a diferenciação em células ósseas, mesmo na ausência de meio indutor. Tais resultados mostram o potencial das NP TB no uso da engenharia do tecido ósseo. Como perspectiva a combinação do anticorpo produzido com os nanobiocompósitos pode favorecer o desenvolvimento de um sistema eficiente que aumente o tempo de permanência do anticorpo no organismo e auxilie no reparo das lesões ósseas causadas pela AR.

Palavras-chave: artrite reumatoide, hidrogel, produção de anticorpos, expressão transiente, NPs.

ABSTRACT

Chronic rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease, characterized by joint inflammation, bone and cartilage destruction. Cytokines, important regulators of the immune and inflammatory response and interleukin-1 β promote inflammation and destruction of synovial tissue, bone, cartilage and joints in patients with RA. The use of anti-interleukin antibodies involved in triggering the inflammatory process of RA is already done, however, it is not the first choice due mainly to the high cost of medications. Hydrogels based on both synthetic and natural polymers have been developed in order to provide a durable and site-specific release of antibodies, decreasing the risks of high dose ingestion of drugs and the discomfort in case of successive applications. The objective of this work was to express, in plant, the anti-IL-1 β -scFab recombinant antibody, to produce and evaluate the biocompatibility of nanobiocomposites for application in the treatment of rheumatoid arthritis. The recombinant anti-IL-1 β -scFab antibody was successfully expressed, and was able to recognize the IL- β antigens in the ELISA assay. The biocompatibility of NP TB with MSCs from human dental pulp was evaluated. NP NPs did not alter cell proliferation, did not increase oxidative stress and did not alter the morphology of MSCs, showing good compatibility. Hydrogels of alginate and bovine bone ECM were produced, supplemented with NP TB. The alginate and alginate hydrogel with NP TB was biocompatible with human dental pulp stem cells. Addition of NP TB did not alter cell proliferation or increase oxidative stress. The hydrogel with NP TB presented higher porosity and viscosity and pH closer to the physiological one, which may favor cell growth. When adding NP TB to the alginate hydrogel, there was an increase in the expression of markers of osteogenic differentiation, *ALP*, *BMP-2* and *BMP-4*, evaluated by RT-qPCR. The ECM and ECM hydrogels with NP TB were also biocompatible. The addition of NP TB does not decrease cell proliferation. In addition, both pure ECM and ECM with NP TB led to the formation of bone nodules and increased expression of ALP. The results demonstrated that human stem cell culture of the nanobiocomposites was able to promote the differentiation in bone cells, even in the absence of inducing medium. These results show the potential of NP TB in the use of bone tissue engineering. It is further intended to combine the antibody produced with the nanobiocomposites in order to establish an efficient system that increases the residence time of the antibody in the organism and aid in the repair of the bone lesions caused by the RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, hydrogel, antibody production, transient expression, NPs.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de células epiteliais. (A) Uma célula cultivada em um substrato de óxido de silício modelado com sulcos de 70 nm de largura 600 nm de profundidade. (B) Uma célula cultivada em substrato de óxido de silício “liso”. Seta: filopódio. (Fonte: Teixeira et al., 2003).
..... 34
- Figura 2: (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de NP TB dispendas em água e (B) Distribuição de tamanho obtida utilizando o Zetasizer..... 42
- Figura 3: Espectro Raman de NP TB. A faixa espectral entre 1.000 e 200 cm^{-1} é mostrada. 43
- Figura 4: Proliferação pelo ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) após 1 (A) e 7 dias (B) de exposição a NPs de titanato de bário. A mesma letra indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. 44
- Figura 5: Atividade de superóxido dismutase após 1 (A) e 7 dias (B) de exposição a NP TB. A mesma letra indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey..... 44
- Figura 6: Morfologia de MSC tratadas com diferentes concentrações de NP TB. Após 1 dia de exposição, não foram observadas alterações na morfologia. Ampliação $\times 100$. Barra de escala = 50 μm 45
- Figura 7: Estrutura química do alginato, mostrando o ácido β -DManurônico (M) e ácido α -L-Gulurônico (G) (Fonte: Lee e Mooney, 2012)..... 56
- Figura 8: Espectro Raman de (a) NP TB, (b) Hidrogel de Alginato com NP TB, (c) Alginato de Sódio. 68
- Figura 9: Caracterização reológica. Viscosidade em função do tempo. Taxa de cisalhamento constante de 57/s. 69
- Figura 10: Hidrogéis de alginato puro e alginato com NP TB. (A) Hidrogel de alginato puro a esquerda e hidrogel com NP TB a direita. (B) Hidrogel de alginato puro, A, e hidrogel de alginato com NP TB, A+T, em meio de cultura.70
- Figura 11: Avaliação da estabilidade dos hidrogéis de alginato e alginato com NP TB. (A) Percentual de intumescência e (B) pH dos hidrogéis. Letras diferentes mostram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A: hidrogel de alginato. AT: hidrogel de alginato com NP TB. 71
- Figura 12: Arquitetura dos hidrogéis de alginato com NP TB (A, B e C) e alginato (D, E e F). Barra de escala: A e D: 100 μm , B e E: 50 μm e C e F: 10 μm . Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente. 72

Figura 13: Avaliação da biocompatibilidade dos hidrogéis com MSCs. (A) Avaliação da proliferação celular por MTT e (B) avaliação do estresse oxidativo, pelo. Letras diferentes significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A: hidrogel de alginato. AT: hidrogel de alginato com NP TB. 73

Figura 14: (A) Células-tronco mesenquimais humanos cultivadas em DMEM-F12, SFB (10%), antibiótico (1%), com (B) Hidrogel de alginato (3%) e (C) Hidrogel de alginato (3%), titanato de bário (0,1%). Aumento 40x. 73

Figura 15: Células-tronco mesenquimais humanos cultivadas com (A) Hidrogel de alginato (3%) e (B) Hidrogel de alginato (3%), titanato de bário (0,1%). Aumento 200x. 74

Figura 16: Nível de expressão gênica relativa de genes marcadores de diferenciação osteogênica. A significa hidrogel de alginato puro e AT hidrogel de alginato com NP TB. * significa que houve diferença estatística ($p < 0,001$). 75

Figura 17: Processo desmineralização osso trabecular. A- Desmineralização com ácido; B- Matriz osso trabecular desmineralizada; C- Retirada de lipídeos; D- Matriz desmineralizada e liofilizada. 108

Figura 18: Processo de desmineralização de lascas de osso cortical bovino com ácido cítrico (1M). A- Dia 1; B-Dia 4; C- Dia 18; D- Dia 28. Em branco nota-se o osso ainda mineralizado e, já transparente, a matriz desmineralizada. . 109

Figura 19: Coloração por HE. A- Osso trabecular bovino não tratado. B- Osso trabecular bovino desmineralizado com ácido clorídrico (0,5 M) e descelularizado com tripsina (0,25%). 109

Figura 20: Coloração com HE. Osso cortical bovino desmineralizado com ácido cítrico. A- Corte transversal, 100X; B- Corte transversal, 200X; C- Corte transversal, 400X. Observa-se lacunas deixadas pela retirada das células... 110

Figura 21: Avaliação da quantidade e qualidade de DNA após tratamento com ácido cítrico. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular desmineralizado; 3: osso trabecular desmineralizado e descelularizado; 4: osso trabecular digerido com pepsina; 5: osso cortical não tratado; 6: osso cortical desmineralizado; 7: osso cortical desmineralizado e descelularizado; 8: osso cortical digerido; 9, 10, 11 e 12: marcadores de massa: 25ng, 50ng, 100 ng, 200 ng. 111

Figura 22: Avaliação da quantidade e qualidade de DNA após tratamento com ácido clorídrico. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular digerido com pepsina; 3, 4 e 5: marcadores de massa: 25ng, 50ng, 100 ng. 111

Figura 23: Eletroforese em gel de agarose do produto da proteólise de hidrogéis de ECM óssea, glicosaminoglicanos. CS: condroitin sulfato; DS: dermatan sulfato; HS: heparan sulfato. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular desmineralizado com ácido cítrico; 3: osso trabecular desmineralizado com ácido clorídrico; 4: osso cortical desmineralizado com ácido cítrico. 112

Figura 24: Espectro Raman de (a) NP TB, (b) Hidrogel ECM, (c) Hidrogel ECM com NP TB.....	113
Figura 25: Caracterização reológica. Viscosidade em função do tempo. Taxa de cisalhamento constante de 57/s.....	114
Figura 26: Arquitetura dos hidrogéis de ECM (A, B e C) e ECM com NP TB (D, E e F). Barra de escala: A e D: 500 μ m, B e E: 100 μ m e C e F: 10 μ m. Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente.....	114
Figura 27: Avaliação da proliferação celular por MTT e após 1 e 7 dias de cultivo celular. Letras diferentes significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ECM: hidrogel de matriz extracelular óssea. ECM + T: hidrogel de matriz extracelular ósseas com NP TB.	115
Figura 28: Morfologia das MSCs cultivadas em com meio basal por 7 (A, B e C), 14 (D, E e F) e 21 dias (G, H e I), em placa de cultura (A, D e G), hidrogel de ECM (B, E e H) e hidrogel de ECM com NP TB (C, F e I). Aumento 40x..	116
Figura 29: Nível de expressão gênica relativa de genes marcadores de diferenciação osteogênica. * significa que houve diferença estatística ($p < 0,001$) pelo teste de Tukey.....	117
Figura 30: Vetor de expressão pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab. Esquema do vetor: https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7WG2/search/index/overexpression/any , acessado em 08/01/18.	140
Figura 31: (A) Estrutura do anticorpo que compõe o medicamento comercial Canakinumab®, a esquerda e esquema de um anticorpo no formato scFab, a direita. Fonte do esquema: Hust et al., 2007. (B) modelo do anticorpo anti-IL-1 β -scFab feito no <i>software</i> Modeller9v19.....	146
Figura 32: (A) Mapa esquemático do pK7WG2D com o <i>casset</i> de expressão do anti-IL-1 β -scFab recombinante. (B) Imagem da eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do pENTR4 e do pUCIDT-KAN- anti-IL-1 β -scFab com <i>Xho</i> I e <i>Nco</i> I. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR do pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab (<i>lanes</i> 1, 2, 3 e 4) e pK7WG2D vazio (<i>lane</i> 5)...	147
Figura 33: Imagens representativas da expressão da GFP em plantas infiltradas. (A) planta controle, infiltrada somente com tampão, e planta infiltrada com <i>Agrobacterium</i> -pK7GW2D-anti-IL-1 β -scFab após (B) 3 dpi, (C) 5 dpi e (D) 6 dpi. Aumento 4x.	148
Figura 34: Acúmulo de GFP no apoplasto. (A) planta infiltrada com tampão e (B) planta infiltrada com <i>Agrobacterium</i> -pK7GW2D-anti-IL-1 β -scFab, 3 dpi..	148
Figura 35: (A) Imagem representativa do ensaio de Western-blot do extrato proteico bruto após 3, 5 e 6 dpi (<i>lanes</i> 1, 2, 3, respectivamente) e extrato proteico de planta infiltrada com tampão (<i>lane</i> 4). Imagem representativa do SDS-PAGE do anti-IL-1 β -scFab purificado (<i>lanes</i> 2 a 6) corado com coomassie	

(B) e prata (C). (D) Western-blot do anti-IL-1 β -scFab purificado (*lanes* 3 e 4), extrato proteico bruto (*lane* 2) e infiltrada com tampão (*lane* 1). 149

Figura 36: Ensaio de ELISA mostrando a ligação antígeno-anticorpo. Foram utilizadas diferentes concentrações do anti-IL-1 β -scFab (0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M) e quantidades diferentes de IL-1 β : (A) 2.000 pg, (B) 1.000 pg, (C) 500 pg e (D) 250 pg. * significa que há diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers usadas para a análise da expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real..... 66

Tabela 2: Sequências dos primers usadas para a análise da expressão gênica relativa por RT-PCR..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
$\mu\text{g mL}^{-1}$	Miligrama por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Mmol	Micromolar
3D	Tridimensional
Ab	Anticorpo
ALP	Fosfatase Alcalina
AR	Artrite reumatoide
AS	Acetoceringona
BMP	Proteínas morfogenéticas ósseas
BSA	Soro de albumina bovina
cDNA	DNA complementar ao RNA mensageiro
CHO	Chinese hamster ovary “ovário de hamster chinês”
CS	Condroitin sulfato
DAPI	4' - 6 - diamidino - 2 – fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpi	Dias pós infiltração
DO	Densidade óptica
DS	Dermatan sulfato
dsDNA	DNA dupla fita
ECM	Extracellular matriz “Matriz extracelular”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Aminopolycarboxylic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
Fab	Porção de ligação ao antígeno
FDA	Food and drugs administration
Fv	Fragmento variável de um anticorpo
g L^{-1}	Gramas por litro
GAG	Glicosaminoglicanos
H	Horas
H & E	Hematoxilina e eosina
HA	Ácido hialurônico
HCl	Ácido clorídrico
HS	Hapain e heparan sulfato
Ig	Imunoglobulina
IGF	Fator de crescimento insulínico
IL	Interleucina
Kda	Kilodaltons
Kg	Kilograma
KS	Queratan sulfato
LB	Meio Lysogny broth
M	Molar

mA	Miliamper
MES	Ácido 4-morfolinoetanossulfônico
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min	Minuto
mg L ⁻¹	Miligrama por litro
mg mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMCD	Medicamentos Modificadores de Curso da Doença
mMol	Milimolar
mPa.s	milipascal-segundo
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MSC	Células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Ng	Nanogramas
Nm	Nanômetro
NP	Nanopartícula
NP TB	NP de titanato de bário
°C	Graus Celsius
OD	Densidade óptica
PAGE	Gel de poliacrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	1,3-diaminopropano
PG	Proteoglicanos
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
p/v	Peso/volume
RGD	Resíduos arginina-glicina-ácido aspártico
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	PCR semi-quantitativa
RT-qPCR	PCR em tempo real
scFv	<i>Single-Chain Fv</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOD	Superóxido dismutase
SRLP	Pequenos proteoglicanos ricos em leucina
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Titanato de Bário
TCV-CP	Capsídeo viral do vírus <i>Turnip crinkle</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	Fator de crescimento transformante
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Fator de necrose tumoral
Tris	<i>(Hydroxymethyl)aminomethane</i>
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	Factor de crescimento endothelial Vascular
VHH	Parte variável da cadeia pesada
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	20
1.1 ARTRITE REUMATOIDE	20
1.2 PERDA ÓSSEA NA ARTRITE REUMATOIDE.....	21
1.3 TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE.....	22
1.4 HIDROGÉIS NA ENGENHARIA DE TECIDOS.....	24
1.5 USO DE HIDROGÉIS PARA ENTREGA DE ANTICORPOS.....	26
1.6 OBJETIVO GERAL	29
1.7 REFERÊNCIAS.....	30
2 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS HUMANAS.....	33
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.2 OBJETIVOS	36
2.2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
2.3.1 MATERIAS E EQUIPAMENTOS.....	37
2.3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	38
2.3.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS)	38
2.3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	38
2.3.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN	38
2.3.6 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ÀS NPS.....	39
2.3.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	39
2.3.8 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	39
2.3.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	40
2.3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
2.4 RESULTADOS.....	42
2.4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP TB	42
2.4.2 AVALIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	43
2.4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO	44
2.4.4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	45
2.5 DISCUSSÃO	46
2.6 CONCLUSÃO.....	49
2.7 REFERÊNCIAS.....	50
3 CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E PONTENCIAL DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE HIDROGEL DE ALGINATO COM NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO.	55
3.1 INTRODUÇÃO	55
3.2 OBJETIVOS	59
3.2.1 OBJETIVO GERAL.....	59
3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
3.3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	60
3.3.2 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS.....	61
3.3.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	61

3.3.4 REOLOGIA.....	62
3.3.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	62
3.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	62
3.3.7 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	63
3.3.7.1 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	63
3.3.7.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	63
3.3.7.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	64
3.3.8 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS.....	64
3.3.8.1 COLORAÇÃO DE VON KOSSA.....	65
3.3.8.2 EXTRAÇÃO DE RNA.....	65
3.3.8.3 PCR EM TEMPO REAL.....	66
3.3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3.4 RESULTADOS.....	68
3.4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	68
3.4.2 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	68
3.4.3 ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS.....	69
3.4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	71
3.4.5 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE HIDROGÉIS.....	72
3.4.6 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS.....	73
3.5 DISCUSSÃO.....	76
3.6 CONCLUSÃO.....	84
3.7 PERSPECTIVAS.....	85
3.8 REFERÊNCIAS.....	86
4 CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO.....	92
4.1 INTRODUÇÃO.....	92
4.2 OBJETIVOS.....	96
4.2.1 OBJETIVO GERAL.....	96
4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	96
4.3 MATERIAS E MÉTODOS.....	97
4.3.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	97
4.3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	97
4.3.3 PRODUÇÃO DE HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA.....	98
Hidrogel de ECM de Osso Cortical.....	99
Hidrogel de ECM de Osso trabecular.....	99
4.3.4 AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE DESCELULARIZAÇÃO.....	100
4.3.4.1 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA.....	100
4.3.4.2 COLOCAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE).....	101
4.3.5 EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS..	102
4.3.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	103
4.3.7 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA.....	103
4.3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	104
4.3.9. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	104
4.3.10 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR.....	105
4.3.11 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA.....	105
4.3.12 EXTRAÇÃO DE RNA.....	106
4.3.13 RT-PCR.....	106

4.3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	107
4.4 RESULTADOS	108
4.4.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO DA ECM	108
4.4.2 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA ECM ÓSSEA	111
4.4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	112
4.4.4 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA	113
4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	114
4.4.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	115
4.4.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR	115
4.4.8 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS	116
4.5 DISCUSSÃO	118
4.6 CONCLUSÃO	124
4.7 PERSPECTIVAS	125
4.8 REFERÊNCIAS	126
5 CAPITULO 4: EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-IL-1 β -scFab EM <i>N. benthamiana</i>	131
5.1 INTRODUÇÃO	131
5.1.1 EXPRESSÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES	131
5.1.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM PLANTAS	133
5.1.3 EXPRESSÃO TRANSIENTE EM PLANTAS	134
5.2 OBJETIVOS	135
5.2.1 OBJETIVO GERAL	135
5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	135
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	136
5.3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	136
5.3.2 MATERIAL VEGETAL	137
5.3.3 DESENHO DO GENE E MONTAGEM DO VETOR	138
5.3.4 PREDIÇÃO ESTRUTURAL	140
5.3.5 ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM TRANSFORMADA DE <i>Agrobacterium</i>	141
5.3.6 EXPRESSÃO TRANSIENTE EM <i>N. benthamiana</i>	142
5.3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	142
5.3.8 ELETROFOSE EM GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)	143
5.3.9 COLORAÇÃO DO SDS-PAGE	143
5.3.10 WESTERN-BLOT	144
5.3.11 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO	144
5.3.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RECONHECIMENTO DO ANTÍGENO	145
5.4 RESULTADOS	146
5.4.1 DESENHO DO GENE E PREDIÇÃO ESTRUTURAL	146
5.4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pK7WG2D-ANTI-IL-1 β -scFab	147
5.4.3 EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-IL-1 β -scFab	147
5.4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RECONHECIMENTO DO ANTÍGENO	149
5.5 DISCUSSÃO	151
5.6 CONCLUSÃO	154
5.7 PERSPECTIVAS	155
5.8 REFERÊNCIAS	156
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	162

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide crônica (AR) é uma doença autoimune, caracterizada por inflamação nas articulações, destruição óssea e de cartilagem (MCINNES e SCHETT, 2011; SINGH et al, 2016). No Brasil, cerca de 900 mil pessoas são portadoras da doença. A doença afeta cerca de 1% da população adulta, de qualquer idade, mas é mais comum em indivíduos entre os 40 e 60 anos de idade e é três vezes mais comum nas mulheres do que nos homens (SCODELER e REZENDE, 2017; MCINNES e SCHETT, 2017).

A causa da AR é desconhecida, porém muitos avanços têm ocorrido no entendimento da patogênese da doença, levando a melhores resultados no tratamento. Todavia, sabe-se que há uma combinação de susceptibilidade genética combinada com fatores ambientais (MCINNES e SCHETT, 2011). Além disso, fatores genéticos se correlacionam também para a resposta ao tratamento e evolução da doença (SCODELER e REZENDE, 2017). Mais de 100 *loci* são associados ao aparecimento e progressão da doença, e a maior parte deles associados a genes efetores imunológicos e seus reguladores (MCINNES e SCHETT, 2017).

As citocinas, importantes reguladores da resposta imune e inflamatória, estão envolvidas em uma cascata relacionada ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Alguns estudos demonstraram que a inibição de TNF- α pelo anti-TNF- α inibe a produção das interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8 e citocinas GM-CSF, que são produzidas localmente em todas as amostras de membrana sinovial reumatoide, independentemente do tempo da doença ou do seu tratamento (ANDREAKOS et al., 2002).

Os macrófagos são células efectoras centrais na inflamação da membrana sinovial. Dentre outros fatores, macrófagos agem através da liberação de citocinas como IL-1, 6, 8, 12, 15, 18 e TNF- α . A família da citocina IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , 18 e 33) é expressa em grande quantidade na AR. Elas promovem a ativação de leucócitos,

células endoteliais, condrócitos e osteoclastos (MCINNES e SCHETT, 2011). A IL-1 β é um mediador pró-inflamatório a nível tecidual que leva à vasodilatação, promove a atração de granulócitos para o tecido inflamado, além de ter um importante papel na indução da expressão de outras citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6. A IL-1 β aumenta a expressão das enzimas da matriz extracelular, como a colagenase 3, a estromelina-1 e as gelatinases tipo A e B que facilitam a destruição da cartilagem articular e também induz a diferenciação dos osteoclastos a partir de células precursoras. A observação das articulações de pacientes com AR revelou altos níveis de IL-1 β na membrana e líquido sinovial (SCHETT et al., 2016).

A utilização de anticorpos que bloqueiem a destruição óssea e da cartilagem pode ser uma estratégia eficaz para o tratamento da AR. De fato, tratamento com anticorpos anti-ILs envolvidas no desencadeamento do processo inflamatório da AR já é uma realidade (MOTA et al., 2012; SCHETT et al., 2016), no entanto o procedimento, apesar de eficaz, não é a primeira escolha devido, ao alto custo dos medicamentos, principalmente em países pobres (HARMSE e REUTER, 2016).

1.2 PERDA ÓSSEA NA ARTRITE REUMATOIDE

A perda óssea ocorre no estágio inicial da AR. Precursores de osteoclastos, responsáveis pela absorção óssea, são ativados por autoanticorpos e em seguida o quadro é agravado pela ação de citocinas pró-inflamatórias (MCINNES e SCHETT, 2017).

A erosão óssea é a principal característica da AR. Tanto o osso cortical como o trabecular sofrem desgaste com a evolução da doença. A erosão óssea articular representa uma perda óssea localizada, inicialmente envolvendo osso cortical. Muitas doenças podem levar a esse quadro, incluindo câncer, hiperparatireoidismo ou doenças inflamatórias crônicas, no entanto a causa mais comum é a AR (SCHETT e GRAVALLESE, 2012).

A inflamação na membrana sinovial induz a osteoclastogênese. Os pequenos canais penetram no osso cortical por microvasos e fazem a conexão entre a membrana sinovial e o interior do osso, a medula óssea. Tais canais facilitam a entrada de precursores de osteoclastos, que em contato com estímulos moleculares diferenciam-se em osteoclastos. O primeiro sintoma de AR em animais modelo é o alargamento desses canais devido à atividade desequilibrada dos osteoclastos. Tal mudança leva a diminuição da massa óssea, relatada em diferentes estudos em pacientes com AR (SCHETT e GRAVALLESE, 2012).

Os osteoclastos são altamente responsivos às interleucinas TNF, IL-1 e IL-6, que aumentam a osteoclastogênese, seja permitindo a expressão do ligante Ativador de Fator Nuclear kappa-B, um mediador osteoclastogênico essencial, em células mesenquimais ou atuando diretamente sobre as células precursoras de osteoclastos (SCHETT e GRAVALLESE, 2012; MCINNES e SCHETT, 2017).

Drogas que inibem IL-1 são utilizadas como medicamentos modificadores de curso da doença (MMCD). O Anakinra® e o Canakinumab® são dois medicamentos que inibem IL-1, porém ambos não estão disponíveis no Brasil para o tratamento da AR (BRATS, 2012; CONITEC, 2016).

1.3 TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE

O tratamento da AR envolve a utilização de anti-inflamatórios não hormonais, que têm ação rápida na diminuição da dor, combinado com uso dos MMCD (COSTA et al., 2014). Tais fármacos são utilizados com objetivo de prevenir o dano e manter a integridade e funcionalidade articular.

A primeira opção é pelo uso de MMCD sintéticos, sendo o metotrexato (MTX) a primeira opção. Uma vez que não haja resposta do paciente a dois MMCD sintéticos, passa-se ao uso de um MMCD biológicos sozinhos ou em combinação com MTX (BURMESTER e POPE, 2017). Conforme revisado por Mota et al. (2012), são utilizados tanto anticorpos completos humanizados ou uma combinação humano-murino, como somente a porção de ligação ao antígeno (Fab) de um anti-

TNF- α humanizado e uma proteína de fusão do receptor solúvel do TNF mais a porção Fc do IgG.

No Brasil, em 2010, foi feita uma pesquisa com reumatologistas e foi constatado que o MMCD biológico mais utilizado era o Infliximabe (IFX), um anticorpo monoclonal anti-TNF quimérico humano-murino, provavelmente por ser o único disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) (CAVALCANTI, 2010). Atualmente já estão disponíveis no Brasil oito MMCD biológicos: abatacepte®, adalimumabe®, certolizumabe pegol®, etanercepte®, golimumabe®, infliximabe®, rituximabe® e tocilizumabe®. Sendo que além do IFX, já disponível há mais tempo, o adalimumabe, um anticorpo humano completo contra TNF, e etanercepte, uma proteína de fusão composta pelo receptor solúvel do TNF mais a região Fc da IgG também já estão disponíveis pelo SUS (BRATS, 2012).

A artrite reumatoide é a doença com maior número de pacientes tratados com anticorpos (ANDREAKOS et al., 2002) e a introdução desses MMCD biológicos ampliou as alternativas para o tratamento efetivo da AR. No entanto, esta opção apresenta um alto custo quando comparada a MMCD sintéticos e, segundo reumatologistas, o principal entrave para o tratamento adequado de pacientes com AR é o alto custo da medicação (MOTA et al., 2012).

Segundo dados do DATASUS (2016), somente de janeiro a outubro de 2015, foram gastos R\$ 20.310.012,43 com internações eletivas e de emergência devido a AR e outras poliartropatias inflamatórias. Em 2011, o valor foi de R\$13.830.164,88 (BRATS, 2012), ou seja, houve um aumento de 31% nos valores gastos pelo governo em internações. Estes dados não incluem medicamentos dispensados pelo SUS em nível ambulatorial. O custo anual do tratamento com um MMCD biológico por paciente é de, em média, R\$20.000,00 (CONITEC, 2016). De 2010 a 2014, houve um gasto pelo Ministério da Saúde de 1,3 bilhão de reais com o tratamento de AR, provocando um impacto médio de 5,76% nos recursos do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (OLIVEIRA, 2015).

Neste sentido, o desenvolvimento de tecnologias que possam diminuir os custos do tratamento da AR afetariam de forma positiva o SUS, diminuindo os gastos do Ministério da Saúde.

1.4 HIDROGÉIS NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Hidrogéis são polímeros hidrofílicos que podem absorver até milhares de vezes o seu peso seco em água. Podem ser quimicamente estáveis ou dissolver. Sua capacidade de absorver água se deve a grupos hidrofílicos acoplados ao polímero e sua resistência à dissolução à reticulação entre as cadeias poliméricas (LEE e MOONEY, 2012; AHMED, 2015).

Atualmente, proteínas e fatores de crescimento podem ser usados no tratamento de doenças e na engenharia de tecidos, onde podem ajudar na mimetização da matriz extracelular, melhorando a comunicação celular, que leva a um reparo mais efetivo do tecido de interesse (CENSI et al., 2012; PADUANO et al., 2016). Apesar dos avanços no uso de proteínas terapêuticas, sua aplicação como fármacos ainda constitui um desafio devido às barreiras ao transporte e liberação dessas macromoléculas no organismo.

Os Hidrogéis surgiram então como uma opção promissora para a bioengenharia de tecidos, pois ao mesmo tempo podem ser utilizados como suporte para o crescimento celular e para a liberação de moléculas moduladoras da matriz extracelular (ECM). De maneira geral, a estrutura dos hidrogéis, conteúdo de água e porosidade mimetizam a estrutura de tecidos, tornando-os propícios para a acomodação de células e liberação de substâncias solúveis, como anticorpos, de maneira prolongada e, até mesmo, de forma injetável, minimamente invasiva (CENSI et al., 2012; LEE e MOONEY, 2012), podendo ser utilizados para o tratamento de regiões extremamente delicadas, como a medula espinhal (TUKMACHEV et al., 2016).

Os hidrogéis podem ser classificados ainda de acordo com sua origem em sintéticos e naturais (AHMED, 2015). Dentre os hidrogéis sintéticos pode-se citar poli (ácido acrílico), poli (etileno glicol), poli (álcool vinil), poliacrilamida e polipeptídeos (CRUZ-ACUÑA e GARCÍA, 2017). Já os hidrogéis de alginato e ECM óssea são classificados como hidrogéis naturais.

Também podem ser classificados levando-se em consideração sua composição em homopolimérico, formada de um único monômero, copolimérico, formado pela combinação de monômeros e também em hidrogéis formados pela

combinação de polímeros que sofreram reticulação e que não sofreram (AHMED, 2015).

Hidrogéis podem ser classificados ainda de acordo com o tipo de reticulação, como químicos ou físicos. Os hidrogéis químicos possuem ligações permanentes. Já os físicos as ligações que formam a reticulação são transientes, dependentes de pH, temperatura, interações iônicas e hidrofóbicas e/ou pontes de hidrogênio (HOFFMAN, 2012; AHMED, 2015). Os hidrogéis de alginato possuem reticulação física. A reticulação é feita pela interação de íons divalente, como íons de cálcio com os blocos do polímero.

Hidrogéis já foram utilizados como tratamento injetável para artrite reumatoide e tanto o hidrogel puro como o hidrogel com dexametasona foram capazes de diminuir os sintomas da doença. No entanto, o combinado com dexametasona apresentou melhores resultados, levando a recuperação quase completa da cartilagem (KIM et al., 2011).

Por outro lado, os hidrogéis podem ter também algumas limitações, como baixa estabilidade em condições fisiológicas, podendo até limitar a viabilidade de células transplantadas. Tais problemas podem ser solucionados com a incorporação de materiais não naturais e naturais ao hidrogel, enriquecendo suas propriedades (LEE e MOONEY, 2012). Cerâmicas, nanotubos de carbono, fosfato de cálcio, peptídeos sintéticos são alguns exemplos de materiais incorporados à hidrogéis para melhorar resistência mecânica, adesão e proliferação celular (VENKATESAN et al., 2015).

O uso de nanopartículas (NPs) associadas à hidrogéis, formando os nanobiocompósitos, é uma forma de melhorar as propriedades do hidrogel, como estabilidade, dureza e elasticidade e acrescentar propriedades de interesse, como potencial de indução de diferenciação celular, propriedades mecânicas, piezoelétricas, antimicrobianas, liberação de drogas, entre outras (SERRA-GOMEZ et al., 2016; SILVA e DREISS, 2016).

O efeito piezoelétrico é a geração de eletricidade em resposta a um estímulo mecânico. O coeficiente piezoelétrico quantifica a variação do volume quando um material piezoelétrico está sujeito a um campo elétrico, ou a polarização na aplicação de um estresse (ZHANG et al., 2014).

O tecido ósseo sofre efeito piezoelétrico devido ao deslizamento das fibras de colágeno umas sobre as outras. O coeficiente piezoelétrico do osso é pequeno e responde a pequenos estresses mecânicos, como o movimento do corpo e leva a formação de um dipolo elétrico, que pode atrair cálcio e fosfato, estimulando, assim, o crescimento ósseo (ZHANG et al., 2014).

Cerâmicas piezoelétricas vêm sendo usadas com objetivo de melhorar o processo de cicatrização de fraturas ósseas. O titanato de bário (TB) é uma das cerâmicas mais estudadas para uso na engenharia de tecido ósseo, devido à sua biocompatibilidade (SERRA-GOMEZ et al, 2016; LI et al., 2017) e além disso, sua propriedade piezoelétrica tem potencial para ser usada como uma fonte de carga, mimetizando o estresse gerado naturalmente pelo deslizamento das fibras de colágeno (ZHANG et al., 2014) e potencialmente tem a capacidade de formar dipolo elétrico e atrair íons de cálcio e fosfato, ajudando na formação óssea.

1.5 USO DE HIDROGÉIS PARA ENTREGA DE ANTICORPOS

O mecanismo mais comum de liberação de drogas de um hidrogel é a difusão passiva, por isso moléculas de diferentes tamanhos podem entrar ou sair livremente de um hidrogel (HAMIDI et al., 2008).

Os mecanismos de liberação de drogas de um hidrogel podem ser divididos em: difusão controlada, controlado pelo nível de intumescimento e quimicamente controlado, sendo o primeiro o comportamento mais aplicável para a liberação de drogas. A difusão é dependente do tamanho dos poros presentes na malha do gel e normalmente nos hidrogéis com aplicação biomédica, o tamanho dos poros varia de 5 a 100 nm (HAMIDI et al., 2008).

A liberação ou entrega prolongada de uma molécula tem como objetivo prover a droga de maneira temporal ou espacialmente controlada no corpo para que seja alcançado o efeito terapêutico desejado. Diversas são as aplicações dos hidrogéis como sistema de entrega de drogas: sistemas orais, transdermais e

implantáveis, sistema de entrega gastro-intestinal, ocular, vaginal e nasal (HAMIDI et al., 2008).

Apesar da grande importância dos anticorpos no tratamento de doenças, formas de entrega prolongada são pouco estudadas e até meados de 2015 nenhum trabalho havia demonstrado um mecanismo eficiente e duradouro de entrega de anticorpos (FLETCHER et al., 2016).

Polímeros injetáveis são desejáveis devido a sua aplicação ser minimamente invasiva. Dentre os polímeros existentes, o aginato é natural e biocompatível, capaz de formar gel e já é amplamente utilizado na entrega de drogas. O uso de hidrogéis feitos a partir de matriz extracelular descelularizada para entrega de drogas também já foi feito, mostrando potencial para a entrega de anticorpos. Como mencionado anteriormente, anticorpos e fragmentos de anticorpos vêm sendo produzidos por técnicas de engenharia genética e sistemas de entrega destes são requeridos. Recentemente, vários hidrogéis baseados tanto em polímeros sintéticos como naturais vêm sendo desenvolvidos a fim de prover uma liberação duradoura e sítio-específica de anticorpos, incluindo IgG, Heceptin; para tratamento de câncer de mama (LEE et al., 2014), Bevacizumab; anti-VEGF (HU et al., 2014), anti-TNF α ; para o tratamento de artrite reumatoide (KAPLAN, BARTHÉLÉMY e GRINSTAFF, 2016), anticorpo PANG; para neutralizar a toxina produzida pelo *Bacillus anthracis*, uma poderosa arma para o bioterrorismo (LIANG et al., 2016).

Fletcher et al. (2016) combinaram hidrogéis de alginato e quitosana e avaliaram as taxas de intumescimento e degradação dos hidrogéis e a taxa de liberação de anticorpos do tipo IgG e a porção Fab do IgG. O hidrogel composto somente de alginato liberou os anticorpos rapidamente, em cerca de três dias. Já a combinação com a quitosana, aumentou o tempo de liberação, que permaneceu constante por aproximadamente 7 semanas. Em relação à porção Fab do anticorpo, a sua liberação ocorreu com 8 dias na combinação de alginato com quitosana. Devido ao menor tamanho da porção Fab é natural que sua liberação seja mais rápida, mas ainda assim, a liberação de forma praticamente linear durante 8 dias é interessante do ponto de vista terapêutico.

Os autores concluíram que as taxas de intumescimento e degradação não influenciam na taxa de liberação dos anticorpos. A interação entre os anticorpos,

com carga negativa, e a quitosana, com carga positiva, foi responsável pela liberação dos anticorpos de forma mais lenta, aumentando o tempo de permanência no gel (FLETCHER et al., 2016).

Portanto o desenvolvimento de um hidrogel capaz de liberar anticorpos de forma prolongada é interessante do ponto de vista terapêutico, visto que o mesmo poderia ser aplicado de forma minimamente invasiva e permaneceria liberando medicamento por um longo período de tempo, diminuindo o incômodo de sucessivas aplicações nos pacientes.

1.6 OBJETIVO GERAL

Produzir e avaliar, *in vitro*, a biocompatibilidade de nanobiocompositos para indução de regeneração óssea e expressar, em planta, o anticorpo recombinante anti-IL-1 β -scFab, para aplicação no tratamento da artrite reumatóide.

1.7 REFERÊNCIAS

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. *Journal of advanced research*, v. 6, p. 105–121, 2015.

ANDREAKOS, E.; TAYLOR, P. C.; FELDMANN, M. Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases. *Current opinion in biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 615-620, 2002.

BRATS. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ce6dd08044ae53989625b66b0d9f14d3/Medicamentos+Biol%C3%B3gicos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 09/01/2016.

CAVALCANTI, F. S. Management of rheumatoid diseases: the Brazilian perspective. *Rheumatology*, v. 49, p. 2231–2232, 2010.

CENSI, R.; DI MARTINO, P.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Hydrogels for protein delivery in tissue engineering. *Journal of controlled release*, v. 161, n. 2, p. 680-692, 2012.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. 2016. Abatacepte para o tratamento da Artrite Reumatoide Moderada a Grave – 1ª linha de tratamento com biológicos após falha aos MMCDs sintéticos. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/Relatorio_Abatacepte_AR_aposfalhaMMCDsinteticos_final.pdf. Acessado em 06/12/2017.

COSTA, J. D. O.; ALMEIDA, A. M.; GUERRA JUNIOR, A. A.; CHERCHIGLIA, M. L.; ANDRADE, E. I. G.; ACURCIO, F. D. A. Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health System: expenditures on infliximab compared to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, 2003-2006. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 30, n. 2, p. 283-295, 2014.

CRUZ-ACUÑA, R.; GARCÍA, A. J. Synthetic hydrogels mimicking basement membrane matrices to promote cell-matrix interactions. *Matrix Biology*, v. 57, p. 324-333, 2017.

Da SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites: nanoparticles to tune gel properties. *Polymer International*, v. 65, n. 3, p. 268-279, 2016.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Morbidade Hospitalar do SUS-por local de internação – Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>, acessado em 09/01/2016.

FLETCHER, N. A.; BABCOCK, L. R.; MURRAY, E. A.; KREBS, M. D. Controlled delivery of antibodies from injectable hydrogels. *Materials Science and Engineering: C*, v. 59, p. 801-806, 2016.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, v. 60, n. 15, p. 1638-1649, 2008.

HARMSE, L.; REUTER, H. An overview of the biological disease modifying drugs available for arthritic conditions in South Africa. *South African Family Practice*, v. 58, n. 6, p. 6-10, 2016.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 18-23, 2012.

HU, C. C.; CHAW, J. R.; CHEN, C. F.; LIU, H. W. Controlled release bevacizumab in thermoresponsive hydrogel found to inhibit angiogenesis. *Bio-medical materials and engineering*, v. 24, n. 6, p. 1941-1950, 2014.

KAPLAN, J. A.; BARTHÉLÉMY, P.; GRINSTAFF, M. W. Self-assembled nanofiber hydrogels for mechanoresponsive therapeutic anti-TNF α antibody delivery. *Chemical Communications*, v. 52, n.34, p.5860-5863, 2016.

KOUTSOPOULOS, S.; ZHANG, S. Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies. *Journal of Controlled Release*, v.160, n. 3, p. 451-458, 2012.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, A. L.; NG, V. W.; GAO, S., HEDRICK, J. L.; YANG, Y. Y. Injectable hydrogels from triblock copolymers of vitamin e-functionalized polycarbonate and poly (ethylene glycol) for subcutaneous delivery of antibodies for cancer therapy. *Advanced Functional Materials*, v. 24, n. 11, p. 1538-1550, 2014.

LIANG, Y.; COFFIN, M. V.; MANCEVA, S. D.; CHICHESTER, J. A.; JONES, R. M.; KIICK, K. L. Controlled release of an anthrax toxin-neutralizing antibody from hydrolytically degradable polyethylene glycol hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 104, n. 1, 113-123, 2016.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p.2328-2337, 2017.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; LIMA, R. A. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide, v. 52, n. 2, 2012.

OLIVEIRA, A. V. D. análise dos gastos do ministério da saúde com medicamentos para tratamento da artrite reumatoide no brasil no período 2010 a 2014. 2015. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Saúde Coletiva). Universidade de Brasília, Brasília.

PADUANO, F.; MARRELLI, M.; WHITE, L. J.; SHAKESHEFF, K. M.; TATULLO, M. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydrogel scaffold derived from decellularized bone extracellular matrix and collagen type I. *PloS one*, v. 11, n. 2, 2016.

SBR. Sociedade Brasileira de Reumatologia. Novas Diretrizes de Tratamento para Artrite Reumatoide (AR). 2017. <https://www.reumatologia.org.br/noticias/novas-diretrizes-de-tratamento-de-artrite-reumatoide-da-sociedade-brasileira-de-reumatologia/>. Acessado em 03 de janeiro de 2018.

SCHETT, G.; DAYER, J. M.; MANGER, B. Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 12, n. 1, p. 14-24, 2016.

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 11, p. 656-664, 2012.

SCODELER, G. C.; REZENDE, F. C. B. E. Avanços e perspectivas dos estudos da artrite reumatoide. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 6, p. 386-391, 2017.

SERRA-GÓMEZ, R.; DREISS, C. A.; GONZALEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-GAITANO, G. Structure and Rheology of Poloxamine T1107 and its Nanocomposite Hydrogels with Cyclodextrin-Modified Barium Titanate Nanoparticles. *Langmuir*, 2016.

SINGH, J. A.; SAAG, K. G.; BRIDGES, S. L.; AKL, E. A.; BANNURU, R. R.; SULLIVAN, M. C.; CURTIS, J. R. 2015 American College of Rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology*, v. 68, n. 1, 1-26, 2016.

TUKMACHEV, D.; FOROSTYAK, S.; ZAVISKOVA, K.; KOCI, Z.; VACKOVA, I.; VYBORNÝ, K.; SYKOVA, E. Injectable extracellular matrix hydrogels as scaffold for spinal cord injury repair. *Tissue Engineering*, v. 22, n. 3-4, p. 306-317, 2016.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules*, v. 72, p. 269-281, 2015.

ZHANG, Y.; CHEN, L.; ZENG, J.; ZHOU, K.; ZHANG, D. Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v. 39, p. 143-149, 2014.

2 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

2.1 INTRODUÇÃO

O comportamento de uma célula é estimulado em resposta ao microambiente ao seu redor. Estruturas na escala micro são geralmente de tamanho similar a uma célula e tipicamente a estimulam pelo seu contato inteiramente com a estrutura. A orientação por contato foi observada pela primeira vez em 1911 e definida como o alongamento e movimento ativo de uma célula, guiados por características topográficas (DALBY et al., 2014).

Já estruturas em escala nano têm características topográficas com várias ordens de magnitude abaixo do encontrado em células. Por isso a resposta das células às nanoestruturas é mais complexa. Nesta escala, as nanoestruturas têm tamanho semelhante a receptores celulares, podendo ativar vias dependentes destes receptores e modular as respostas das células (DALBY et al., 2014).

Os receptores envolvidos na adesão celular são as integrinas. As integrinas são proteínas transmembrana pelas quais as células interagem com superfícies adjacentes. Peptídeos ligam-se externamente às integrinas e estas modulam o citoesqueleto internamente (DALBY et al., 2014), controlando expressão gênica, crescimento celular, diferenciação e apoptose (KREIS e VALE, 1999).

Alguns estudos já demonstraram que a densidade de ligantes e até mesmo a maneira como são distribuídos, pode interferir no comportamento da célula, influenciando sua morfologia e provocando até a morte celular no caso de poucos ligantes disponíveis (CAVALCANTI-ADAM et al., 2008; SCHVARTZMAN et al., 2011)

Filopódios são projeções da membrana celular na escala nano com integrinas e por meios deles a célula é capaz de explorar a superfície ao seu redor, reconhecendo nanoestruturas de apenas 10 nm. Inicialmente, os filopódios alinham-se com as nanoestruturas da superfície, em seguida toda a célula é alinhada. Acredita-se que o limite pelo qual nanoestruturas podem influenciar filopódios é 35

nm (DALBY et al., 2014). Em fenômeno denominado *nanoprinting*, a organização do citoesqueleto é similar a nanotopografia da superfície que a célula cresce (CURTIS, et al., 2006). A Figura 1 ilustra a mudança na forma da célula e o seu direcionamento influenciado pela superfície de crescimento.

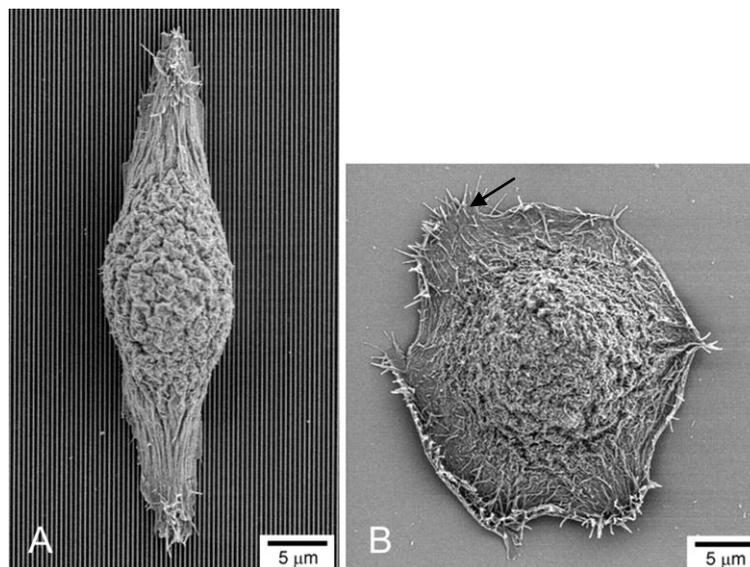


Figura 1: Microscopia eletrônica de varredura de células epiteliais. (A) Uma célula cultivada em um substrato de óxido de silício modelado com sulcos de 70 nm de largura 600 nm de profundidade. (B) Uma célula cultivada em substrato de óxido de silício "liso". Seta: filopódio. (Fonte: Teixeira et al., 2003).

Para a aplicação biomédica dos nanomateriais, o mais importante é avaliar a sua biocompatibilidade e entender suas propriedades físico-químicas e como estas influenciam respostas biológicas diversas (KUNZMANN et al., 2011; HUBBELL e CHILKOTI, 2012). O sistema de defesa do organismo, responde a "invasão" de corpos estranhos, incluindo partículas, por isso a interação entre NPs e o sistema imune são importantes na engenharia de tecidos quando se tem como objetivo a aplicação *in vivo* (KUNZMANN et al., 2011).

Além disso, a degradação e eliminação das NPs têm grande importância e deve-se avaliar o seu tempo de permanência no organismo e as consequências a longo prazo de sua acumulação (KUNZMANN et al., 2001).

O tamanho das NPs mostrou-se importante na determinação de toxicidade. As NPs podem causar toxicidade devido ao seu tamanho, grande área superficial, morfologia e novas características químicas e físicas que surgem quando os materiais estão na escala nanométrica. Variando-se o tamanho de NPs do

mesmo material, obtiveram-se respostas diferentes em relação à morte celular, indução de resposta inflamatória e toxicidade. No geral, NPs menores mostram-se mais tóxicas que as maiores (KUNZMANN et al., 2011; YAO et al., 2015; SEIFFERT et al., 2015).

Além do tamanho, a área superficial também influencia na toxicidade das NPs, já que uma área de superfície maior pode causar maior reatividade partículas próximas, podendo resultar em efeitos possivelmente danosos. Também a morfologia, aglomeração podem influenciar na toxicidade (SHIN, SONG e UM, 2015).

O uso de materiais em escala nanométrica para a engenharia de tecido ósseo tem-se demonstrado promissor, já que tais materiais estão em escala semelhante a componentes do tecido ósseo, considerado um nanocompósito (HENKEL et al., 2013; PINA et al., 2015), ou seja, um tecido com diversos componentes, sendo alguns deles em escala nano.

Alguns estudos usaram TB ou NP TB combinados com outros biomateriais para mimetizar o tecido ósseo e focados na avaliação da capacidade composta para induzir a diferenciação celular utilizando células-tronco de animais (SHOKROLLAHI et al., 2017; LI et al., 2017; JIAO et al., 2017). No entanto, poucos estudos abordando a toxicidade de NP TB foram relatados e nenhum estudo avaliou o seu potencial citotóxico utilizando células-tronco mesenquimais humanas. Ciofani et al. (2010) mostraram que as NP TB conjugadas com glicol-quitosano não alteraram a viabilidade de células de H9C2 cultivadas *in vitro*. Da mesma forma, Dubey et al. (2015) não observaram efeitos tóxicos *in vivo* de implantes contendo compostos de hidroxiapatita com NP TB em camundongos. No entanto, esses dois estudos foram iniciais e utilizaram TB NPs conjugados com outros materiais, o que pode ter minimizado sua toxicidade, já que a funcionalização diminui o potencial tóxico das NPs (MORRIS et al., 2016). Uma vez que os potenciais efeitos tóxicos de NP TB puros em células-tronco mesenquimais humanas são desconhecidos, são necessários estudos para garantir a segurança em futuras aplicações biomédicas.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de NPs de titanato de bário (NP TB) usando células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana (MSCs) como modelo biológico.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer a caracterização físico-química das NP TB;
- Avaliar a proliferação de MSCs expostas às NP TB;
- Avaliar o estresse oxidativo de MSCs expostas às NP TB;
- Avaliar a morfologia das MSCs expostas às NP TB.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais utilizados: NPs de titanato de bário (NP TB) (Lote MKBF7837V, <100 nm e fase cristalina cúbica, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (DMEM-F12) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), antibiótico (100 UI / mL de penicilina, 100 µg de estreptomicina mL⁻¹, LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil), SFB (LGC biotecnologia, São Paulo Brasil), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma Aldrich, Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), superóxido dismutase (SOD) Assay Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), tripsina 0,25% (LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil), tampão fosfato-salino (PBS) (LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil).

Os equipamentos utilizados: Centrifuga (5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), centrífuga (mini spin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), agitador magnético (IKA HS 7, Biovera, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), capela de fluxo (Class II BSC, Esco, Cingapura), banho-maria (FANEM, São Paulo, Brasil), Espectrometro Raman Bruker RFS 100 (Bruker, EUA), Microscópio invertido (Nikon TS100F, Melville, EUA), Microscópio de varredura (DSM 950, Zeiss, Alemanha), espectrômetro (RFS 100, Bruker, EUA), Incubadora (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), sonicador (UP200S, Hielscher, Teltow, Alemanha), Malvern Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, Reino Unido), Espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA), AxionVision 4.9.1 (Zeiss, Alemanha).

As células-tronco utilizadas se encontram armazenadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC – CONEP 22/2015) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

2.3.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As NP TB foram dispersas no meio de cultura DMEM-F12. Resumidamente, foram adicionadas NP TB ($1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$) ao meio de cultura suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). A amostra foi sonicada por 2 ciclos de 1 minuto (ciclo 0,5, amplitude 70) utilizando um sonicador. Em seguida, as soluções utilizadas nos testes de citocompatibilidade foram preparadas em concentrações de 0,1, 10, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.3.3 ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (DLS)

Para avaliar a estabilidade das NP TB em meio de cultura de células, a distribuição de tamanho de partícula e Potential Zeta (ZP) da dispersão de NPs ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram analisadas usando Zetasizer. Para ambas as análises, cada aquisição foi realizada três vezes, em amostras adequadamente diluídas em meio de cultura de células.

2.3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Amostras de NP TB foram preparadas por dispersão ultra-sônica em água e depositadas em uma grade de cobre revestida de carbono. As NP TB foram caracterizadas por MEV usando microscópio Zeiss-DSM 950 com uma tensão de aceleração de 6 kV.

2.3.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd + 3 / YAG a 1.064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos a uma resolução de 4 cm^{-1} . Uma média de 1.024 scans foi coletada com uma potência de laser de 110 mW.

2.3.6 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS ÀS NPS

As MSCs foram plaqueadas em uma placa de 24 poços (1×10^4 células, para análise da morfologia) e 96 poços (5×10^3 células, para MTT e SOD). Para todos os ensaios biológicos, as células foram cultivadas *in vitro* em DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v), cultivadas a 37 ° C, 5% de CO_2 , por 24 horas antes da exposição. Depois disso, as células foram expostas à NP TB em diferentes concentrações: 0 (controle não tratado), 0,1, 10, 50, 100 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 1 ou 7 dias a 37 ° C, 5% de CO_2 .

2.3.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

As MSCs humanas foram plaqueadas em placas de 24 poços, com 1 mL de meio DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). Após 1 dia de cultura para adesão celular, o meio de cultura foi retirado e um novo meio contendo NP TB (0 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado. A morfologia celular foi avaliada após 1 dia de exposição às diferentes concentrações de NP TB com um microscópio de luz invertido. As imagens foram geradas utilizando o programa AxionVision 4.9.1.

2.3.8 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As MSCs humanas foram plaqueadas em placas de 96 poços, em meio DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). Após 1 dia de cultura para adesão celular, o meio de cultura foi retirado e um novo meio contendo NP TB (0 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado. Após 1 e 7 dias de período de exposição às diferentes concentrações de NPs *in vitro*, as células foram lavadas três vezes usando PBS (1x) com o objetivo de remover NPs. A avaliação da proliferação celular das MSCs foi realizada utilizando o ensaio de MTT. Resumidamente, foram adicionados 20 μL de solução MTT (5 mg mL^{-1}) a 180 μL de DMEM-F12, então foram adicionados 200 μL a cada poço e incubou-se durante 4 h a 37 ° C, 5% CO_2 . Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 200 μL de álcool isopropílico ácido (HCl 0.4M em álcool-isopropílico) e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C para o rompimento das células e dissolução dos cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em oituplicata e repetidos duas vezes.

2.3.9 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A SOD, enzima que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, foi quantificada em todos os grupos. As MSCs humanas foram plaqueadas em placas de 96 poços, em meio DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). Após 1 dia de cultivo para adesão celular, o meio de cultura foi retirado e um novo meio contendo NP TB (0 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado. Após 1 e 7 dias de período de exposição *in vitro* às diferentes concentrações de NPs, as células foram lavadas três vezes com PBS (1x), tripsinizadas e lisadas por congelamento e descongelamento. Então, foram adicionados 60 μL de PBS (1x), as amostras foram centrifugadas a 2.000 g x 5 minutos, 4 °C e 20 μL do sobrenadante foram utilizados para proceder ao ensaio de acordo com as instruções do kit. A mudança colorimétrica com uma absorbância de 450 nm foi detectada utilizando espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

2.3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por one-way ANOVA e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os dados são apresentados como média aritmética \pm erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP TB

Uma imagem de MEV de NPs é apresentada na Figura 2A. A imagem mostra estruturas dispersas com partículas individuais aproximadas de 50 nm e alguns agregados, com presença de arestas, tendendo a uma geometria cúbica. No entanto, a distribuição do diâmetro hidrodinâmico das suspensões NP TB em meio de cultura foi $148,7\text{nm} \pm 0,4\text{ nm}$ (Figura 2B). O Zetasizer exibiu um ZP de $-13,0 \pm 0,04\text{ mV}$ em meio de cultura de DMEM-F12 suplementado com SFB (10%) e antibiótico (1%).

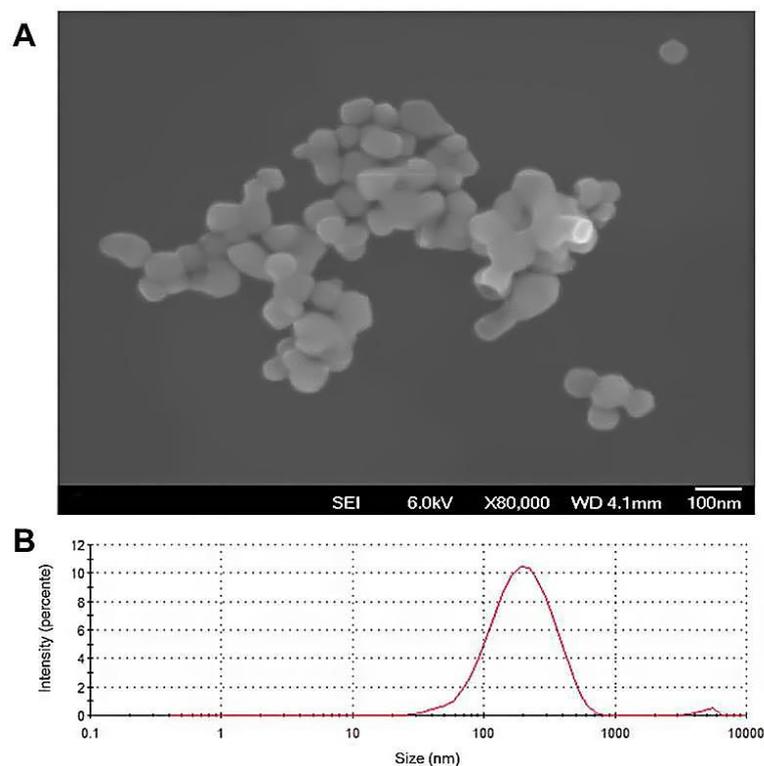


Figura 2: (A) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de NP TB dispesadas em água e (B) Distribuição de tamanho obtida utilizando o Zetasizer.

A espectroscopia de Raman foi usada para caracterizar a composição das NP TB. Picos Raman de NP TB foram localizados a 192 cm^{-1} , 306 cm^{-1} , 511 cm^{-1} ,

716 cm^{-1} atribuídos em [A1 (TO), E (LO)]; (B1, E (TO + LO)); (A1 (TO), E (TO)) e (A1 (LO), E (LO)), respectivamente (Figura 3).

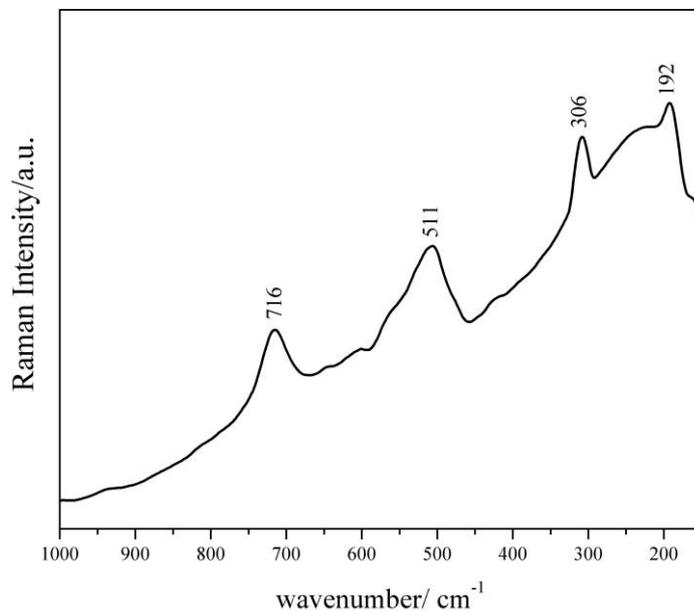


Figura 3: Espectro Raman de NP TB. A faixa espectral entre 1.000 e 200 cm^{-1} é mostrada.

2.4.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular não foi afetada ($p > 0,05$) após 1 dia de exposição aos NP TB. No entanto, após 7 dias de exposição de NP na maior concentração, a proliferação celular de $1.000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ foi inibida ($p < 0,05$) em comparação com o controle não tratado (Figuras 4A e 4B).

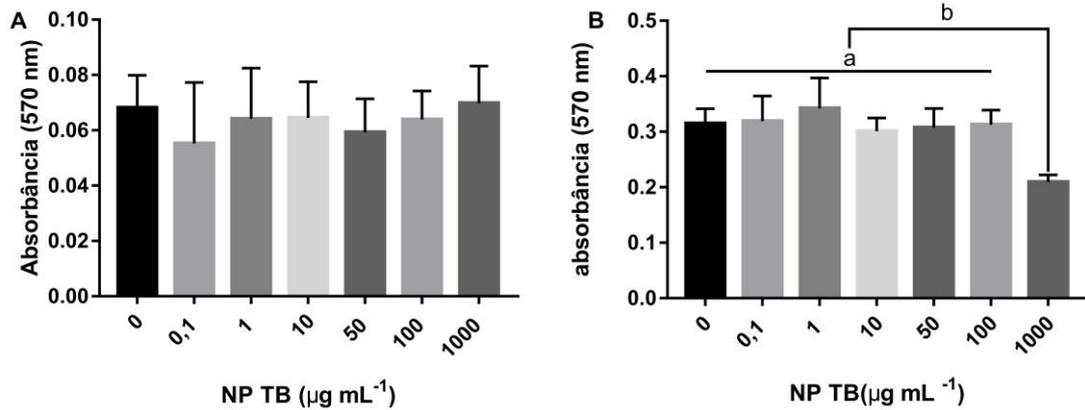


Figura 4: Proliferação pelo ensaio de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT) após 1 (A) e 7 dias (B) de exposição a NPs de titanato de bário. A mesma letra indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

2.4.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

As SODs são enzimas responsáveis pela eliminação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), protegendo as células dos danos associados aos radicais livres. A atividade de SOD foi medida após 1 e 7 dias de cultura de MSCs em contato com as NP TB. Em ambos os tempos de exposição, não houve diferença ($p > 0,05$) na atividade SOD entre as células expostas às NP TB e células não expostas (Figuras 5A e 5B).

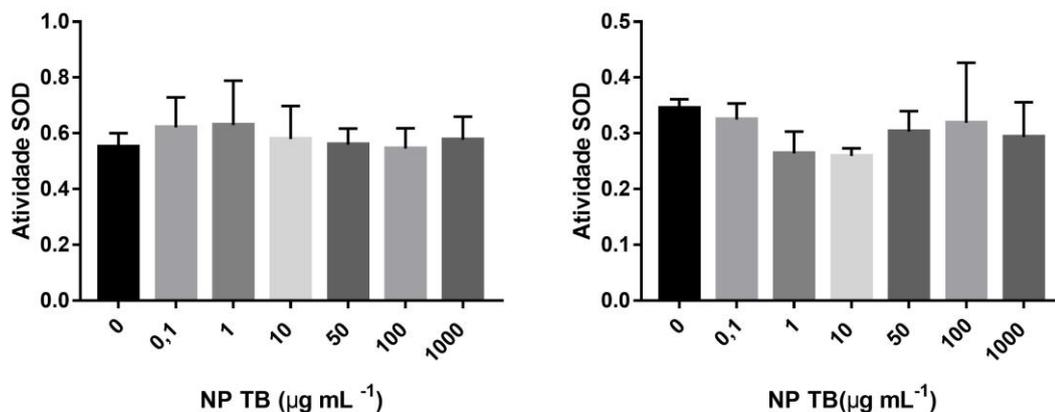


Figura 5: Atividade de superóxido dismutase após 1 (A) e 7 dias (B) de exposição a NP TB. A mesma letra indica que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

2.4.4 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

As NP TB não alteraram a morfologia das MSCs quando comparadas ao controle não exposto, após 1 dia de exposição às NP TB. Na concentração de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, as NP TB estavam depositadas nas células, mas não foi observada alteração na morfologia típica fibroblastóide, na qual as células são alongadas e fusiformes (Figura 6).

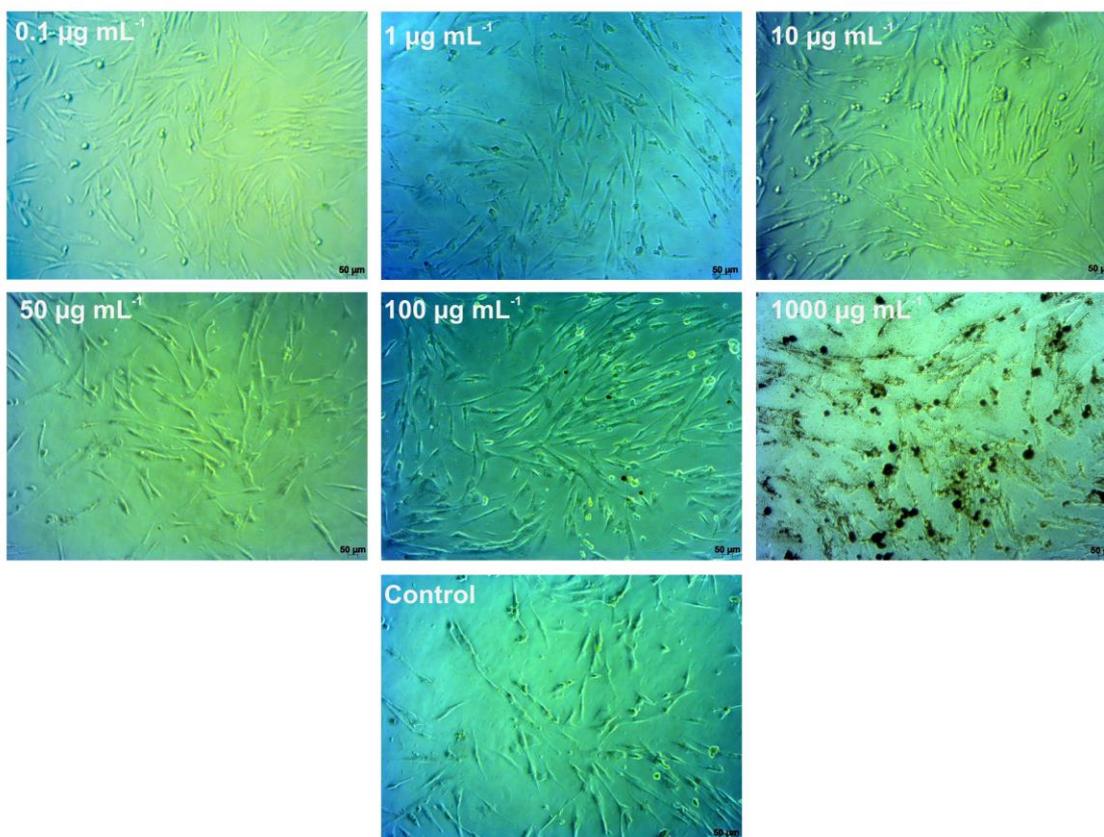


Figura 6: Morfologia de MSC tratadas com diferentes concentrações de NP TB. Após 1 dia de exposição, não foram observadas alterações na morfologia. Ampliação $\times 100$. Barra de escala = $50 \mu\text{m}$.

2.5 DISCUSSÃO

Nenhum estudo de biocompatibilidade deste nanomaterial com MSCs humanas foi encontrado na literatura, por isso, neste estudo primeiro foi proposta uma investigação preliminar *in vitro* sobre a citocompatibilidade de NP TB em MSCs humanas. Estudos anteriores mostraram biocompatibilidade de NP TB em diferentes tipos de células como neuroblastoma (CIOFANI et al., 2010), células H9C2 (CIOFANI et al., 2010), células-tronco mesenquimais de ratos (CIOFANI et al., 2013), fibroblastos murinos (células L929) (ZHANG et al., 2014) e fibroblasto NIH3T3 (SERRA-GÓMEZ et al., 2016).

Inicialmente, foi feita a caracterização das NPs por MEV, estudos de dispersão de luz dinâmica e espectroscopia Raman. As imagens de MEV revelaram NPs dispersas e também formação de agregados (Figura 2A) e o DLS mostrou um diâmetro hidrodinâmico médio de $148,7\text{nm} \pm 0,4\text{ nm}$ (Figura 2B). O tamanho das NPs é uma característica chave que determina a interação, endocitose celular e a toxicidade de muitas NPs, que demonstram ser dependentes do tamanho (VISWANATH e KIM, 2016) e não apenas o tamanho, mas a superfície desempenha um papel importante na toxicologia de NPs (ADABI et al., 2016). A assinatura de Raman (Figura 3) da fase tetragonal das NP TB é observada a 306 cm^{-1} , enquanto a banda larga a 513 cm^{-1} pode ser atribuída a um modo vibracional muito específico da fase cúbica intrínseca (HIROMICHI et al, 2013; LARA et al, 2017), corroborando a imagem obtida por MEV.

A carga superficial afeta o comportamento das partículas no ambiente biológico, influenciando as interações célula-membrana, penetração, adsorção de proteínas e estabilidade no fluido biológico (ADABI et al., 2016). No presente estudo, o potencial zeta das NP TB foi $-13,0 \pm 0,04\text{ mV}$. Este valor sugere uma pequena instabilidade da suspensão coloidal. Está bem definido que potencial zeta de nano partículas em suspensão com intervalos acima (\pm) 30 mV levam a estabilidade e evitam a agregação das NPs em meio aquoso (ADABI et al., 2016). Estudos anteriores mostraram que NPs de carga negativa são, em geral, mais biocompatíveis com o crescimento celular, que NPs catiônicas. As NPs catiônicas geralmente apresentam mais toxicidade associada à ruptura da membrana celular devido à

interação com as membranas celulares com carga negativa (CLOGSTON e PATRI, 2011; ADABI et al., 2016). Assim, a biocompatibilidade das NP TB com MSCs observada neste trabalho e descrita abaixo pode estar relacionada à sua carga negativa.

Para verificar a proliferação celular das MSC expostas às NP TB, foi utilizado o ensaio MTT. A proliferação celular é um parâmetro importante amplamente utilizado para medir citotoxicidade. O MTT é metabolizado nas mitocôndrias e as células viáveis, com metabolismo ativo convertem o MTT em formazan, um cristal roxo e sua quantidade é presumivelmente diretamente proporcional ao número de células proliferativas (RISS et al., 2016). No ensaio MTT, as NP TB apresentaram biocompatibilidade com as MSC (Figuras 4A e 4B), após 1 dia de exposição, uma vez que não afetaram a proliferação celular quando comparados ao controle não exposto ($p < 0,05$).

No entanto, após exposição em longo prazo, 7 dias, apenas a maior concentração utilizada, $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$, causou inibição da proliferação ($p < 0,05$) (Figura 4B). É possível que isso tenha ocorrido devido a mudanças nos parâmetros fisiológicos celular. O titanato de bário é uma cerâmica com propriedades piezoelétricas e sua capacidade de induzir a formação óssea está bem descrita na literatura (RAJABI et al., 2015; GENCHI et al., 2016).

O processo de formação óssea tem diferentes estágios, incluindo proliferação celular, diferenciação, mineralização e pós-mineralização. Em um estudo avaliando a expressão gênica por PCR em tempo real, verificou-se que após 7 dias de cultura, a proliferação celular diminui e começa a expressão de marcadores para a diferenciação celular osteoblástica (CHOI et al., 2011). Assim, é possível hipotetizar que, no presente trabalho, as MSCs expostas à alta concentração de NP TB foram estimuladas a se diferenciar em células ósseas. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a diferenciação MSCs induzida por NP TB pura.

Para investigar o estresse oxidativo, foi examinada a atividade da SOD. O mecanismo mais importante de toxicidade de NP é devido à produção de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ao DNA, degradação proteica e disfunção tecidual (GAILLET e ROUANET, 2015, KHANNA et al., 2015, MOUTHUY et al., 2016). Os radicais superóxido (O^{-2}), os radicais hidroxílicos (HO^{\cdot}) e a produção

de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são as principais causas de estresse oxidativo (GAILLET e ROUANET, 2015). SOD é uma enzima antioxidante que protege eficientemente as células contra esses eventos biológicos nocivos (FU et al., 2014). No ensaio de SOD, o radical superóxido, formado após a oxidação da hipoxantina pela Xantina Oxidase, reduz a WST-1 a um formazan amarelo. A SOD inibe a atividade da xantina oxidase, portanto, quando as células estão estressadas, a SOD evita a formação de formazan pela inibição da xantina oxidase e o formazan não é produzido (PESKIN e WINTERBOURN, 2017). No presente estudo, não foram observadas alterações na atividade SOD para MSCs após a exposição à NP TB em comparação com controles não tratados ($p > 0,05$, Figura 5). Esses dados indicam que as NP TB não causam estresse oxidativo em MSCs.

Outro mecanismo de toxicidade de NPs é a alteração morfológica da célula. Estudos anteriores mostraram que o rompimento do citoesqueleto de actina por exposição à NPs pode afetar a morfologia celular e causar lesões celulares (BUYUKHATIPOGLU e CLYNE, 2010; DUAN et al., 2013; HAVRDOVA et al., 2016). Neste trabalho, a morfologia celular de MSC expostas às NP TB foi analisada por microscopia de luz. Conforme mostrado na Figura 6, após 1 dia as células cultivadas com NP TB, apresentaram morfologia alongada e fibroblástica típicas de células-tronco e eram semelhantes ao controle não exposto.

Na maior concentração, observou-se uma deposição de NP TB de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas células (Figura 6), contudo não identificou alteração na morfologia da célula, não evidenciando efeito citotóxico das NPs.

2.6 CONCLUSÃO

Este trabalho fornece informações sobre a compreensão do comportamento de MSCs após a exposição *in vitro* a NP TB. As NP TB não alteraram a proliferação celular após 1 dia de exposição em nenhuma das concentrações avaliadas e após 7 dias de exposição houve alteração da proliferação somente na exposição à maior concentração testada, 1.000 mg mL⁻¹. Não houve aumento do estresse oxidativo e nem alteração na morfologia das MSCs em nenhuma das concentrações testadas, tanto após 1 dia como após 7 dias de exposição. A citocompatibilidade dessas NP abre novas possibilidades para aplicações de engenharia de tecidos.

2.7 REFERÊNCIAS

ADABI, M.; NAGHIBZADEH, M.; ADABI, M.; ZARRINFARD, M. A.; ESNAASHARI, S. S.; SEIFALIAN, A. M.; GHANBARI, H. Biocompatibility and nanostructured materials: applications in nanomedicine. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 44, n. 4, p. 1049-1193, 2016.

BUYUKHATIPOGLU, K.; CLYNE, A. M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 96, n. 1, p. 186-195, 2011.

CAVALCANTI-ADAM, E. A.; AYDIN, D.; HIRSCHFELD-WARNEKEN, V. C.; SPATZ, J. P. Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location. *HFSP Journal*, v. 2, p. 276–285, 2008.

CHOI, M. H.; NOH, W. C.; PARK, J. W.; LEE, J. M.; SUH, J. Y. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Periodontal & Implant Science*, v. 41, n. 4, p. 167-175.

CIOFANI, G.; DANTI, S.; D'ALESSANDRO, D.; MOSCATO, S.; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy. *Nanoscale research letters*, v. 5, n. 7, p. 1093–1101, 2010.

CIOFANI, G.; DANTI, S.; D'ALESSANDRO, D.; MOSCATO, S.; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy. *Nanoscale Research Letters*, v. 5, n. 7, 2010a.

CIOFANI, G.; DANTI, S.; MOSCATO, S.; ALBERTAZZI, L.; D'ALESSANDRO, D.; DINUCCI, D.; MENCIASSI, A. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: Potential applications in biomedicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, p. 535–543, 2010b.

CIOFANI, G.; RICOTTI, L.; CANALE, C.; D'ALESSANDRO, D.; BERRETTINI, S.; MAZZOLAI, B.; MATTOLI, V. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 312-320, 2013.

CIOFANI, G.; RICOTTI, L.; CANALE, C.; D'ALESSANDRO, D.; BERRETTINI, S.; MAZZOLAI, B.; MATTOLI, V. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 312–320, 2013.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: S. E. MCNEIL (ed.), *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Methods in Molecular Biology. Springer, 2011, p. 63-70.

CURTIS, A. S.; DALBY, M. J.; GADEGAARD, N. Nanoprinting onto cells. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 3, n. 8, p. 393-398, 2006.

DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R. O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature materials*, v.13, n. 6, p. 558-569, 2014.

DENG, J.; XU, S.; HU, W.; XUN, X.; ZHENG, L.; SU, M. Tumor targeted, stealthy and degradable bismuth nanoparticles for enhanced X-ray radiation therapy of breast cancer. *Biomaterials*, v. 154, p. 24-33, 2018.

DUAN, J. YU, Y.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y.; ZHOU, X.; SUN, Z. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PloS one*, v. 8, n. 4, 2013.

DUBEY, K.; THRIVIKRAMAN, G.; BASU, B. Absence of systemic toxicity in mouse model towards BaTiO₃ nanoparticulate based eluate treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 2, 2015.

FU, P. P.; XIA, Q.; HWANG, H. M.; RAY, P. C.; YU, H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 22, p. 64-75, 2014.

GAILLET, S.; ROUANET, J. M. Silver nanoparticles: their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 77, p. 58-63, 2015.

GENCHI, G. G.; MARINO, A.; ROCCA, A.; MATTOLI, V.; CIOFANI, G. Barium titanate nanoparticles: promising multitasking vectors in nanomedicine. *Nanotechnology*, v. 27, n. 23, 2016.

GENCHI, G. G.; MARINO, A.; ROCCA, A.; MATTOLI, V.; CIOFANI, G. Barium titanate nanoparticles: promising multitasking vectors in nanomedicine. *Nanotechnology*, v. 27, 2016.

HAVRDOVA, M.; HOLA, K.; SKOPALIK, J.; TOMANKOVA, K.; PETR, M.; CEPE, K.; ZBORIL, R. Toxicity of carbon dots—Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, v. 99, p. 238-248, 2016.

HAYASHI, H.; NAKAMURA, T.; EBINA, T. In-situ Raman spectroscopy of BaTiO₃ particles for tetragonal–cubic transformation, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 74, p. 957-962, 2013.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C.; HUTMACHER, D. W. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. *Bone research*, v. 1, n.3, p. 216-248, 2013.

LARA, J. P. H.; PÉREZ LABRA, M.; BARRIENTOS HERNÁNDEZ, F. R.; ROMERO SERRANO, J. A.; ÁVILA DÁVILA, E. O.; THANGARASU, P.; HERNÁNDEZ RAMIREZ, A. Structural Evolution and Electrical Properties of BaTiO₃ Doped with Gd³⁺. *Materials Research*, v. 20, n. 2, p. 538-542, 2017.

HIROMICHI, H., NAKAMURA, T., EBINA, T. In-situ Raman spectroscopy of BaTiO₃ particles for tetragonal–cubic transformation. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, v. 74, p. 957-962, 2013.

HUBBELL, J. A.; CHILKOTI, A. Nanomaterials for drug delivery. *Science*, v. 337, n. 6092, p. 303–305, 2012.

HURST, K. E.; LUTHER, J. M.; BAN, C.; CHRISTENSEN, S. T. Nanomaterials for Energy Applications. In: MANSFIELD, E. et al., *Nanomaterials for Energy Applications. Metrology and Standardization of Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations*. Winley, 2017, cap. 28, p. 505-518.

JIAO, H.; ZHAO, K.; BIAN, T.; TANG, Y. Hydrothermal synthesis and properties characterization of barium titanate/hydroxyapatite spherical nanocomposite materials. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 715, p. 73-82, 2017.

KAUR, J.; PATHAK, T.; SINGH, A.; KUMAR, K. Application of Nanotechnology in the Environment Biotechnology. In: KUMAR R., SHARMA A., AHLUWALIA S. *Advances in Environmental Biotechnology*. Springer Singapore, 2017, p. 155-165.

KHANNA, P.; ONG, C.; BAY, B. H.; BAEG, G. H. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. *Nanomaterials*, v. 5, p. 1163-1180, 2015.

KIM, K. S.; PARK, S. J.; YANG, J. A.; JEON, J. H.; BHANG, S. H.; KIM, B. S.; HAHN, S. K. Injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta biomaterialia*, v. 7, n.2, p. 666-674, 2011.

KREIS, T.; R. VALE. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins*. 2. Ed. Oxford University Press, 1999.

KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H., SCHEYNIUS, A., FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810 n. 3, p. 361-373, 2011.

LI, Y.; XIAOHAN, D.; YUNYANG, B.; YUN, L.; WANG, Y.; LIU, O.; YAN, F.; TANG, Z.; ZHANG, X.; DENG, X. Electroactive BaTiO₃ nanoparticle-functionalized

fibrous scaffold enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4007–4018, 2017.

MORRIS, A. S.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; LEHMAN, S. E.; WONGRAKPANICH, A.; THORNE, P. S.; LARSEN, S. C.; SALEM, A. K. Amine modification of nonporous silica nanoparticles reduces inflammatory response following intratracheal instillation in murine lungs. *Toxicology letters*, v. 241, p. 207-215, 2016.

MORRIS, A. S.; ADAMCAKOVA-DODD, A.; LEHMAN, S. E.; WONGRAKPANICH, A.; THORNE, P. S.; LARSEN, S. C.; SALEM, A. K. Amine modification of nonporous silica nanoparticles reduces inflammatory response following intratracheal instillation in murine lungs. *Toxicology Letters.*, v. 22, p. 207-215, 2016.

MOUTHUY, P. A.; SNELLING, S. J.; DAKIN, S. G.; MILKOVIĆ, L.; GAŠPAROVIĆ, A. Č.; CARR, A. J.; ŽARKOVIĆ, N. Biocompatibility of implantable materials: An oxidative stress viewpoint. *Biomaterials*, v. 109, p. 55-68, 2016.

NOBILE, S.; NOBILE, L. Nanotechnology for biomedical applications: Recent advances in neurosciences and bone tissue engineering. *Polymer Engineering & Science*, v. 57, p. 644-650, 2017.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 103, p. 188-191, 2017.

PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Advanced Materials*, v. 27, n. 7, p. 1143-1169, 2015.

RAJABI, A. H.; JAFFE, M.; ARINZEH, T. L. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. *Acta Biomaterialia*, v. 24, p. 12–23, 2015.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Assay guidance manual: cell viability assays, 2016.

SADEGHI, R.; RODRIGUEZ, R. J.; YAO, Y.; KOKINI, J. L. Advances in nanotechnology as they pertain to food and agriculture: benefits and risks. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 8, p. 467-492, 2017.

SAMAREH, J. A.; SIOCHI, E. J. Systems analysis of carbon nanotubes: opportunities and challenges for space applications. *Nanotechnology*, v. 28, n. 37, 2017.

SERRA-GÓMEZ, R.; DREISS, C. A.; GONZÁLEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-GAITANO, G. Structure and Rheology of Poloxamine T1107 and its Nanocomposite Hydrogels with Cyclodextrin-Modified Barium Titanate Nanoparticles, *Langmuir*, v. 32, n. 25, p. 6398–6408, 2016.

SCHVARTZMAN, M.; PALMA, M.; SABLE, J.; ABRAMSON, J.; HU, X.; SHEETZ, M. P.; WIND, S. J. Nanolithographic control of the spatial organization of cellular adhesion receptors at the single-molecule level. *Nano letters*, v. 11, n. 3, p. 1306-1312, 2011.

SHIN, S. W.; SONG, I. H.; UM, S. H. Role of physicochemical properties in nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, v. 5, n. 3, p.1351-1365, 2015.

SHOKROLLAHI, H.; SALIMI, F.; DOOSTMOHAMMADI, A. The Fabrication and characterization of barium titanate/akermanite nanobio-ceramic with a suitable piezoelectric coefficient for bone defect recovery. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 74, p. 365–370, 2017.

SEIFFERT, J.; HUSSAIN, F.; WIEGMAN, C.; LI, F.; BEY, L.; BAKER, W.; ZHANG, J. Pulmonary toxicity of instilled silver nanoparticles: Influence of size, coating and rat strain. *PloS one*, v.10, n. 3, 2015.

TEIXEIRA, A. I.; ABRAMS, G. A.; BERTICS, P. J.; MURPHY, C. J.; NEALEY, P. F. Epithelial contact guidance on well-defined micro-and nanostructured substrates. *Journal of cell science*, v. 116, n. 10, p. 1881-1892, 2003.

VISWANATH, B.; KIM, S. Influence of Nanotoxicity on Human Health and Environment: The Alternative Strategies. In: DE VOOGT P. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, 2016. p. 61-104.

YAO, M.; HE, L.; MCCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Uptake of gold nanoparticles by intestinal epithelial cells: impact of particle size on their absorption, accumulation, and toxicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.63, n. 36, p.8044-8049, 2015.

ZHANG, Y.; CHEN, L.; ZENG, J.; ZHOU, K.; ZHANG, D. Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 39, p. 143–149, 2014.

3 CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E PONTENCIAL DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE HIDROGEL DE ALGINATO COM NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO.

3.1 INTRODUÇÃO

O alginato é um polímero conhecido, derivado de algas marrons, como *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera*. Sua extração é feita com solução aquosa alcalina, geralmente NaOH (VENKATESAN et al., 2015).

O alginato é largamente utilizado na engenharia de tecidos devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, relativo baixo custo, simplicidade do processo de gelificação, que é realizado com cátions divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Sr^{2+} , além da aprovação da agência Americana para o controle de medicamentos e alimentos (FDA) e degradação relativamente lenta (PINA et al., 2015; LEIJTEN et al., 2017). Estudos demonstrando a eficiência de hidrogéis de alginato combinados com fatores de crescimento já comprovaram capacidade de aumentar a diferenciação osteogênica e eficiência do reparo do tecido ósseo (LEE e MOONEY, 2012).

O alginato é um copolímero linear composto de ácido β -D-Manurônico (M) e ácido α -L-Gulurônico (G). Esses monômeros são arranjados em estrutura de blocos, sendo que sua composição e distribuição variam com a fonte do alginato (CHAN et al., 2002; LEE e MOONEY, 2012) (Figura 7). Essa estrutura de blocos determina as propriedades físicas do polissacarídeo e particularmente no tipo de gel formado (FINOTELLI, 2010), assim como biocompatibilidade, nível de adesão e proliferação celular e capacidade de indução de diferenciação osteogênica (VENKATESAN et al., 2015).

Na engenharia de tecidos, biomateriais de alginato estão sendo muito explorados, pois já demonstraram facilitar a regeneração de diversos tecidos e órgãos, incluindo osso, pele, nervos, fígado e pâncreas (VENKATESAN et al., 2015).

Diversos métodos são utilizados para a preparação dos biomateriais incluindo liofilização, *eletrospinning* e reticulação, cuja maioria dos agentes são baseados em cálcio (VENKATESAN et al., 2015; REAKASAME e BOCCACCINI, 2017). Até mesmo células são capazes de fazer a reticulação, pois uma vez que o polímero seja modificado com ligantes para a adesão celular, a mesma célula é capaz de ligar-se com diversas cadeias poliméricas, levando a uma reticulação reversível (LEE e MOONEY, 2012).

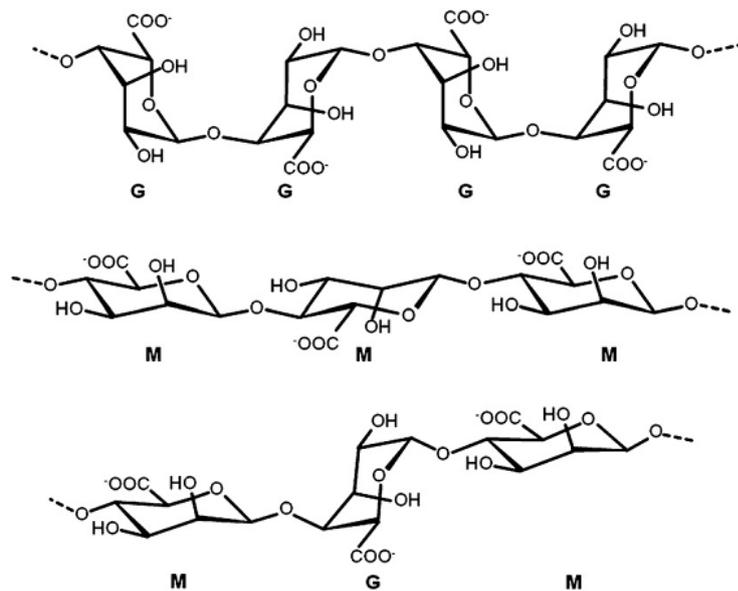


Figura 7: Estrutura química do alginato, mostrando o ácido β -DManurônico (M) e ácido α -L-Gulurônico (G) (Fonte: Lee e Mooney, 2012).

Comercialmente estão disponíveis alginatos de baixo e alto peso molecular, variando de 37 KDa a 400 KDa. Em trabalhos de regeneração de tecido ósseo comparando-se alginatos de baixo (37 KDa) e alto (196 KDa) peso molecular, observou-se que o de baixo peso molecular tem taxa de degradação maior, sendo, portanto, melhor o uso de alginato de médio a alto peso molecular para fins de regeneração de tecidos duros, como o tecido ósseo (VENKATESAN et al., 2015). A escolha do alginato para produção de hidrogéis, então, deve levar em consideração o tipo de tecido a ser regenerado.

Os hidrogéis de alginato são produzidos majoritariamente pela reticulação com cloreto de cálcio, carbonato de cálcio ou sulfato de cálcio. Os hidrogéis de alginato já são utilizados na engenharia de tecidos, entrega de drogas, devido a sua

similaridade estrutural com ECM e na cicatrização de feridas (LEE e MOONEY, 2012; VENKATESAN et al., 2015).

Estudos prévios avaliaram a toxicidade do alginato na cultura de células-tronco e também em sua capacidade de indução de diferenciação (HWANG et al., 2009; ZHU et al., 2013). Problemas relacionados à reação imune, em geral, são causados por impurezas que podem haver caso o processo de purificação não seja efetivo (LEE e MOONEY, 2012).

O uso de hidrogéis de alginato para entrega do grupo de fatores de crescimento proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), conhecidamente com papel na formação óssea, foi feito com sucesso, aumentando a regeneração do tecido ósseo (CHANG et al., 2010). Adicionalmente, células-tronco mesenquimais são capazes de diferenciar-se em diversas linhagens, incluindo células osteogênicas quando cultivadas em biomateriais. Hidrogéis de alginato são utilizados para o entrega destas células a locais lesionados. Trabalhos mostraram maior eficiência no reparo de lesões ósseas, viabilidade celular e/ou aumento da expressão de genes marcadores de diferenciação óssea, quando as células foram cultivadas em hidrogéis ou *beads* de alginato (ABBAAH et al., 2006; ZHAO et al., 2010)

A nanotopografia da superfície de cultivo, mostrou-se capaz, pelo menos em parte, de controlar o fenótipo das células, notavelmente no processo de diferenciação celular de células-tronco mesenquimais humanas (DALBY et al., 2014).

Diferenças na organização da nanotopografia, podendo esta ter padrões aleatórios ou não, influenciam na adesão da célula e no seu destino com relação à manutenção de pluripotência ou diferenciação em uma linhagem específica. Células diferenciadas, como fibroblatos, mostram fraca adesão a superfícies altamente organizadas (DALBY et al., 2014).

A diferenciação óssea parece ser induzida por superfícies com uma certa organização, mas não altamente organizadas e nem totalmente ao acaso. Colágeno do tipo X e do tipo I, presente em maior quantidade na matriz extracelular óssea, tem organização desordenada, mas não completamente ao acaso. Nanotopografias que mimetizam tal organização mostraram-se capazes de induzir a diferenciação óssea com eficiência semelhante a do meio de cultura específico para tal finalidade

(DALBY et al., 2007) e também ser capaz de manter a capacidade de autorenovação de células-tronco da medula óssea (MCMURRAY et al., 2011).

A mecanotransdução de sinal pode ser então considerada importante no controle do fenótipo da célula. Neste tipo de transdução, a célula converte um sinal mecânico em uma resposta bioquímica. Considerando que o citoesqueleto está diretamente ligado ao núcleo, uma alteração na adesão celular induz modificações no formato da célula e consequente reorganização do citoesqueleto, que leva a uma alteração também no formato do núcleo, influenciando a organização cromossômica e a expressão gênica (INGBER, 2006; DALBY et al., 2014; PINA et al., 2015).

Além desta capacidade mecanoindutora de modificar o fenótipo de uma célula, o uso de nanomateriais tem o potencial de aumentar a estabilidade e o tempo de circulação de agentes terapêuticos (LEE et al., 2014).

Para regeneração de tecidos duros como osso, o alginato em si carece de força mecânica, por isso sua combinação com materiais que mimetizem os componentes inorgânicos da ECM óssea pode melhorar sua capacidade de indução de osteogênese. O alginato combinado com hidroxapatita demonstrou ser uma boa opção de biomaterial para engenharia de tecido ósseo e entrega de células e fatores de crescimento (OLDERØY et al., 2012). Esse polímero também já foi combinado com fosfato octacálcio (FUJI et al., 2009) e fosfato de cálcio (ZHAO et al., 2010). A combinação com tais componentes mostrou-se mais eficiente no aumento da proliferação celular e na indução de diferenciação osteogênica do que o uso do alginato somente.

Neste trabalho foi produzido um hidrogel de alginato com NPs de titanato de bário para possível utilização na regeneração de tecido ósseo perdido em casos de artrite reumatoide.

O TB é uma das cerâmicas mais estudadas para uso na engenharia de tecido ósseo, devido a sua piezoelectricidade. Tal propriedade tem potencial para ser usada como uma fonte de carga, mimetizando o estresse gerado naturalmente pelo deslizamento das fibras de colágeno (ZHANG et al., 2014) e potencialmente tem a capacidade de formar dipolo elétrico e atrair íons de cálcio e fosfato, ajudando na formação óssea.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um nanobiocompósito para o potencial tratamento da perda óssea na artrite reumatoide.

3.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer a caracterização físico-química do hidrogel;
- Avaliar, *in vitro*, a biocompatibilidade do hidrogel com MSCs;
- Avaliar o potencial de indução de diferenciação osteogênica do hidrogel com NP TB.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais utilizados: NPs de titanato de bário (NP TB) (Lote MKBF7837V, <100 nm e fase cristalina cúbica, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Alginato de sódio viscosidade média (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (DMEM-F12) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), antibiótico (100 UI mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina) (LGC biotecnologia, São Paulo Brasil), soro bovino fetal (LGC biotecnologia, São Paulo Brasil), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), superoxide dismutase (SOD) Assay Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), tripsina 0,25% (LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil), tampão fosfato-salino (PBS) (LGC biotecnologia, São Paulo Brasil), RNeasy micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), DNase I (Qiagen, Hilden, Alemanha), kit transcrição reversa (SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Os equipamentos utilizados: centrífuga (5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), centrífuga (mini spin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), capela de fluxo (Class II BSC, Esco, Cingapura), banho-maria (FANEM, Brasil), agitador magnético (IKA HS 7, Biovera, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), Liofilizador (L101, Liotop, São Carlos, Brasil), metalizador (Desk V, Denton Vacuum, Moorestown, USA), microscópio invertido (Eclipse TS100, Nikon, Japão), microscópio eletrônico de varredura (EM 6610-LV, JEOL, São Paulo, Brasil), espectrômetro (RFS 100, Bruker, EUA), incubadora (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), sonicador (UP200S, Hielscher, Teltow, Alemanha), Malvern Zetasizer Nano ZN (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido), Varioskan flash (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), reômetro (HAAKE-VT550, Thermo Fisher Scientific,

Waltham, Massachusetts, EUA), Real Time PCR (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Foster City, CA, USA), GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

As células-tronco utilizadas encontram-se armazenadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC – CONEP 22/2015) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.3.2 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS

A solução do alginato foi preparada com alginato de sódio de viscosidade média (Sigma Aldrich-W201502) dissolvido em água destilada autoclavada à concentração final de 3% (p/v). Para preparação do hidrogel de alginato com NP TB, antes da solubilização do alginato de sódio, as NP TB foram dispersas na água à concentração final de 0,1% (p/v). O reticulação dos dois hidrogéis foi feito com cloreto de cálcio à concentração final 0,4% (v/v). Os hidrogéis foram armazenados a 4 ° C até o uso.

3.3.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd + 3 / YAG a 1.064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos a uma resolução de 4 cm⁻¹. Uma média de 1.024 scans foi coletada com uma potência de laser de 110 mW. As medições foram feitas no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da UFJF.

3.3.4 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

Os hidrogéis foram mantidos a 4 ° C durante o transporte e armazenamento. Para a caracterização reológica aproximadamente 2 mL de amostra foram posicionadas sobre a placa do reômetro HAAKE-VT550. A placa foi mantida a 37 ° C durante todo o ensaio. Foram capturados os dados de tensão de cisalhamento a cada 30 segundos durante 3.600 segundos. A taxa de cisalhamento (escorregamento) da placa foi mantida constante em 57 /s.

3.3.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

A fim de avaliar a estabilidade dos hidrogéis foi feita avaliação do pH e ensaio de intumescência.

Para o ensaio do pH, foi feita a medição no momento em que os experimentos foram iniciados. Para tal, 1 mL de cada hidrogel foi aliqotado em tubos de 15 mL, em triplicata, cobertos com 1 mL meio de cultura DMEM-F12 e mantidos em incubadora umidificada com 5% de CO₂, a 37 ° C, por 7 dias, quando pH foi medido novamente.

O ensaio de intumescimento foi feito de acordo com Da Silva et al. (2009) com pequenas modificações. Brevemente, 1 mL de cada hidrogel, em triplicata, foi aliqotado em tubos de 15 mL e o material foi pesado. Cada amostra foi então coberta com 1 mL de DMEM-F12 e mantida em incubadora umidificada com 5% de CO₂, a 37 ° C. Após 1 e 7 dias, o meio de cultura não absorvido foi retirado e a amostra foi pesada novamente. O grau de intumescência foi medido utilizando a seguinte fórmula: $(\text{massa final} - \text{massa inicial}) / \text{massa inicial} \times 100$. Os ensaios foram feitos em triplicata, repetidos duas vezes.

3.3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras do hidrogel de alginato e alginato com titanato de bário foram desidratadas por liofilização. Em seguida, o material seco foi colocado em stub de alumínio utilizando uma fita de carbono adesiva (77816, EMS-EUA). A metalização foi feita em atmosfera de argônio com ouro em um metalizador, utilizando corrente de 30 mA por 60 segundos e espessura aproximada de 200 Å. A visualização do material foi realizada em microscópio eletrônico de varredura operado a 20 kV com filamento de tungstênio. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

3.3.7 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS

3.3.7.1 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As MSCs foram cultivadas em meio de crescimento DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). As células foram incubadas em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ a 37 ° C. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Para a subcultura de rotina, as células foram desprendidas por tripsinização quando cerca de 80% de confluência foi atingida.

3.3.7.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As MSCs (1×10^3) foram plaquedas em placas de 96 poços. Após 1 dia para adesão celular, 100 µL de cada hidrogel foram adicionados. Após 1 e 7 dias de cultura com os hidrogéis, estes foram removidos e as células foram lavadas três vezes usando PBS (1x). A avaliação da proliferação celular da MSCs foi realizada utilizando o ensaio de MTT. Resumidamente, adicionou-se 20 µL de solução MTT (5

mg mL⁻¹) a 180 µL de DMEM-F12, em cada poço e incubou-se durante 4 horas a 37 ° C, 5% CO₂. Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico ácido e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 ° C para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em oitoplicata e repetidos duas vezes.

3.3.7.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

A SOD, que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, foi quantificada em todos os grupos. As MSCs (2 x 10³) foram plaquedas em placas de 96 poços. Após 1 dia para adesão celular, 100 µL de cada hidrogel foram adicionados. Após 1 e 7 dias de período de exposição às diferentes concentrações de NPs *in vitro*, as células foram lavadas três vezes usando PBS (1x), tripsinizadas e lisadas por congelamento e descongelamento. Posteriormente foram adicionados 60 µL de PBS (1x), as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos, 4 ° C e 20 µL do sobrenadante foram utilizadas para proceder ao ensaio de acordo com as instruções do kit. A mudança colorimétrica com uma absorbância de 450 nm foi detectada utilizando espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes.

3.3.8 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS

A fim de avaliar a diferenciação óssea em hidrogéis de alginato e hidrogéis de alginato com NP TB, as MSC cultivadas, por 21 dias. Inicialmente 1 x 10⁴ MSCs foram plaqueadas em placa de 24 poços. Após 1 dia para adesão celular, 1 mL de cada hidrogel foi adicionado. Como controle, foram cultivadas MSCs sem

hidrogel. Também como controle, MSCs foram cultivadas com cloreto de cálcio na mesma concentração utilizada para a reticulação do alginato (dados não mostrados).

Foi feita coloração de Von Kossa e avaliação da expressão de genes marcadores de diferenciação óssea por reação da polimerase em tempo real (RT-qPCR) utilizando os *primers* descritos na Tabela 1.

3.3.8.1 COLORAÇÃO DE VON KOSSA

A fim de avaliar a diferenciação óssea, foi feita a coloração de *Von Kossa* após 21 dias de cultivo das MSCs com os hidrogéis. Os hidrogéis foram retirados cuidadosamente da placa com auxílio de pipeta e a coloração foi feita somente nas células que aderiram ao fundo da placa. Foi feita lavagem com PBS (1X) a fim de retirar os resquícios de hidrogel. Em seguida, foram adicionados 500 µL de nitrato de prata 1% (p/v) e a placa foi exposta à luz UV por 30 minutos.

A placa foi então lavada por 10 minutos com água destilada duas vezes. Foi feito o tratamento com tiosulfato de sódio 1% (p/v), por 30 segundos e nova lavagem com água. A contracoloração foi feita com ácido pícrico por 15 minutos e, após a secagem, foi feita a lavagem com álcool para retirar o excesso de corante.

3.3.8.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada após 7 e 21 dias de cultivo das MSCs com os hidrogéis. A extração de RNA foi feita utilizando o RNeasy micro Kit, a partir de 2×10^5 MSCs, de acordo com manual de instruções. Para isso, DNase I foi utilizada de acordo com manual de instruções a fim de obter RNA puro. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando Nanodrop 2000.

3.3.8.3 PCR EM TEMPO REAL

Para quantificar o nível de expressão gênica relativa foi feita a transcrição reversa do RNA utilizando o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix*, de acordo com as instruções do Fabricante. Os níveis de mRNA para a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4), fosfatase alcalina (ALP) e proteína retinoblastoma (PtnRet) foram quantificados por RT-qPCR em seis-plicata. Para cada reação foram utilizados 75 ng de cDNA, 0,25 µM de cada *primers* (F e R), 5 µL de 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix em um volume final de 10 µL. A quantidade ótima de cDNA a ser utilizada foi determinada em experimentos anteriores. As reações foram feitas no equipamento de Real Time PCR. As condições da reação de RT-qPCR para todos os primers foram: desnaturação inicial a 95 ° C por 10 minutos e 45 ciclos por 95 ° C por 15 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 ° C por 1 minuto.

Tabela 1: Sequências dos primers usadas para a análise da expressão gênica relativa por reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5´-3´)	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Fragmento
ALP	F: CCAAAGGCTTCTTCTTGCTG R: CCACCAAATGTGAAGACGTG	60°C	189
BMP-2	F: TCAAGCCAAACACAAACAGC R: TGATCAGCCAGAGGAAAAGG	60°C	162
BMP-4	F: TGATACCTGAGACGGGGAAG R: CCAGACTGAAGCCGGTAAAG	60°C	199
PtnRet	F: CAGGGTTGTGAAATTGGATCA R: GGCCTTCTCGGTCCTTTGATTGTT	60°C	440
GAPDH	F: AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT R: AACGTGTCAGTGGTGGACCTG	60°C	160
β-Actina	F: ATTAAGGAGAAGCTGTGCACGTC R: GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG	60°C	213

Após cada reação, foi realizada uma análise da curva de fusão (*melting*) para confirmar que um produto único específico foi gerado. Como controle negativo, uma reação para cada par primer sem ácidos nucleicos, também foi executada. A expressão dos genes *GAPDH* e *β-Actina* foi utilizada como gene de controle

endógeno. O hidrogel de alginato puro foi utilizado como calibrador para avaliação da expressão dos genes de interesse pelas células cultivadas no hidrogel de alginato combinado com NP TB. A eficiência de cada primer para cada reação foi calculada usando o software LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). A ferramenta de software de expressão relativa (REST) foi utilizada para quantificar a expressão de mRNA de cada gene alvo.

3.3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas utilizando GraphPad Prism 7.0. Foi feita one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises relativas da expressão gênica foram realizadas pelo programa REST (PFAFFL et al., 2002) usando um teste de randomização fixa de reatribuição em pares e foram baseados na eficiência dos primers.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Amostras de alginato de sódio, TB e um hidrogel baseado em alginato de sódio e NP TB foram analisadas nos espectros Raman (Figura 8). Uma banda forte foi localizada a 2.934 cm^{-1} no alginato de sódio, enquanto é menos resolvido no hidrogel com NP TB. A deformação C-H é encontrada como um pico marcado em torno de 1.307 e 1.305 cm^{-1} , respectivamente. As amostras de compostos poliméricos apresentam as bandas de alongamento assimétricas características dos íons carboxilato (COO^-) a 1.651 e 1.617 cm^{-1} . Foram também encontradas bandas na região entre $1.200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$. As bandas características do TB não foram encontradas.

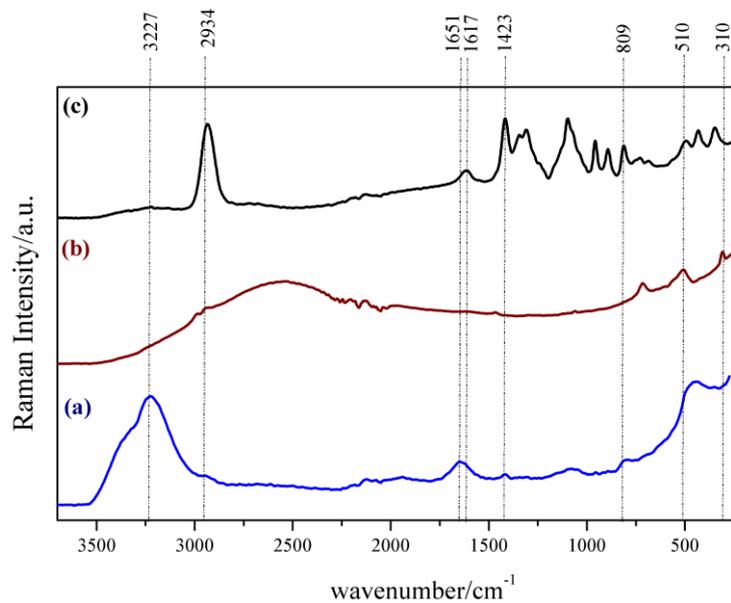


Figura 8: Espectro Raman de (a) NP TB, (b) Hidrogel de Alginato com NP TB, (c) Alginato de Sódio.

3.4.2 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

A medição da viscosidade foi feita durante 1 hora. A adição de NP TB ao hidrogel de alginato aumentou sua viscosidade (Figura 9). Os hidrogéis foram armazenados a 4 ° C. Ao serem transferidos para o reômetro, a 37 ° C, simulando a temperatura fisiológica, a viscosidade inicial foi de 366 mPa·s para o hidrogel de alginato puro e 397 mPa·s para o hidrogel de alginato com NP TB e a viscosidade aumentou com o passar do tempo (s). Após 40 minutos, a viscosidade do hidrogel de alginato puro manteve-se estável, enquanto a do hidrogel de alginato com NP TB continuou aumentando até o final da medição.

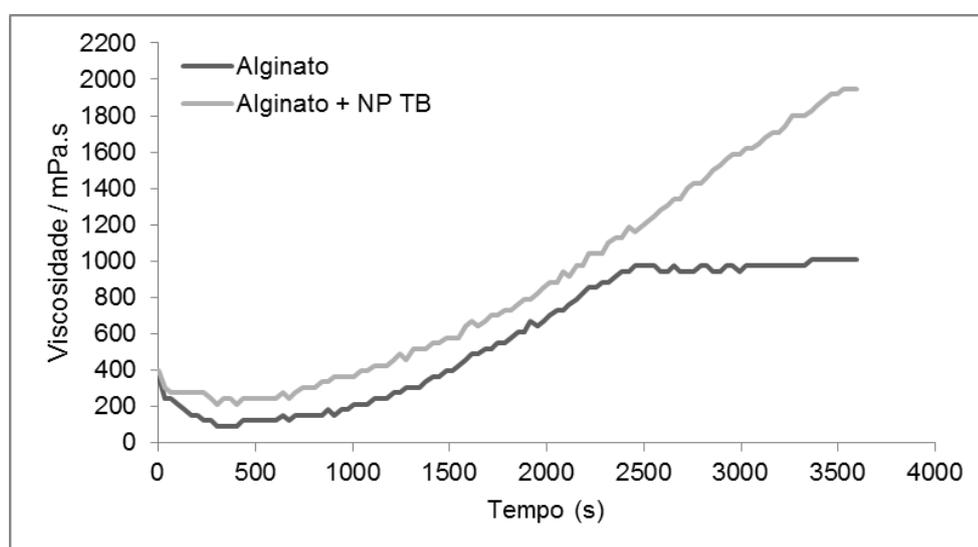


Figura 9: Caracterização reológica. Viscosidade em função do tempo. Taxa de cisalhamento constante de 57/s.

3.4.3 ESTABILIDADE DOS HIDROGÉIS

A fim de avaliar o comportamento dos hidrogéis de alginato 3% (p/v), puro e combinado com NP TB 0,1% (p/v) (Figura 10), em contato com meio de cultura, foram medidos os percentuais de intumescência e pH.

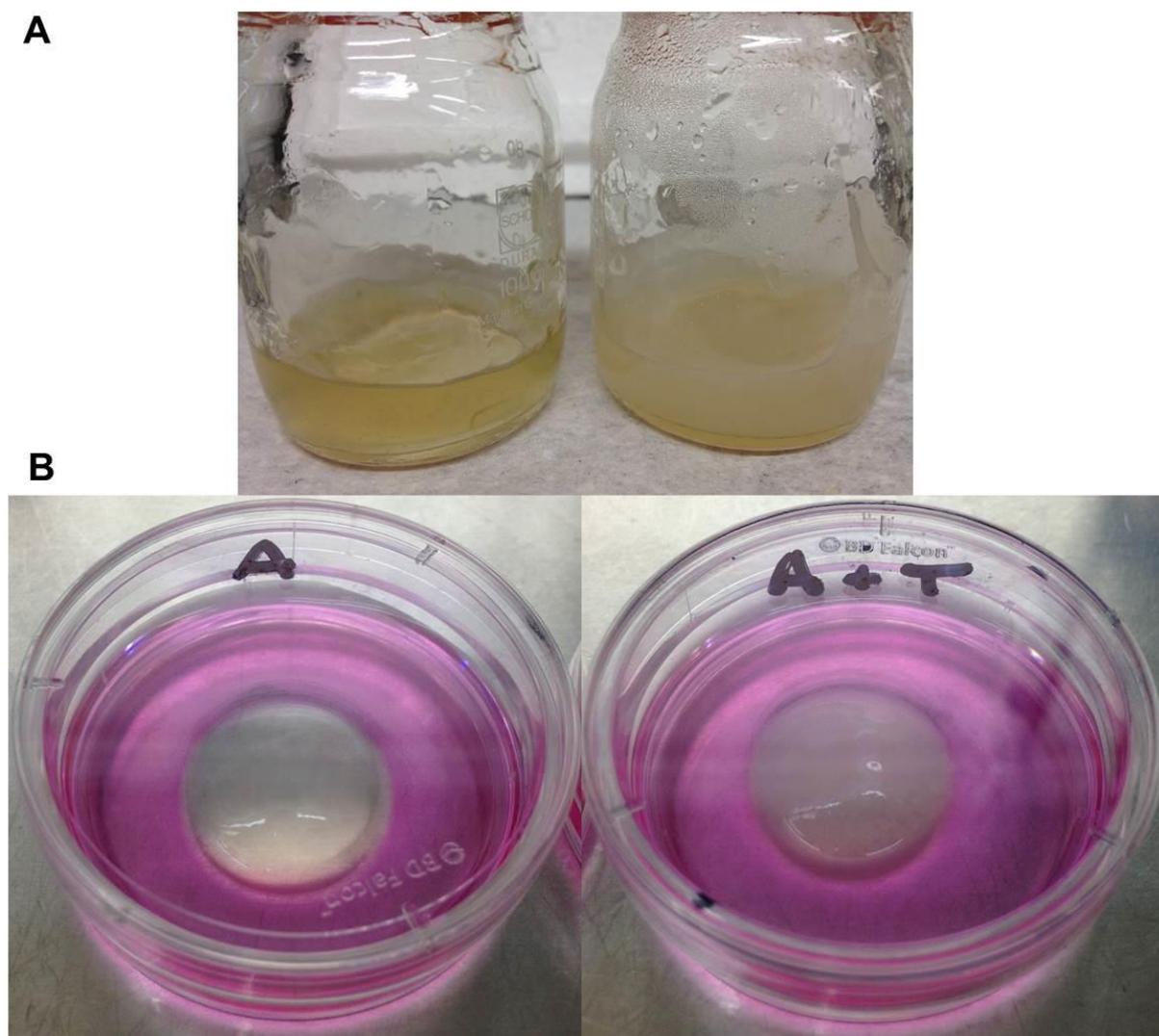


Figura 10: Hidrogéis de alginato puro e alginato com NP TB. (A) Hidrogel de alginato puro a esquerda e hidrogel com NP TB a direita. (B) Hidrogel de alginato puro, A, e hidrogel de alginato com NP TB, A+T, em meio de cultura.

Após 24 horas da preparação os percentuais de intumescência do hidrogel de alginato puro e do hidrogel com NP TB foram de 2,35 % ($\pm 0,22$) e 2,92% ($\pm 0,12$), respectivamente. Após 7 dias da preparação, os percentuais de intumescência do hidrogel de alginato puro e do hidrogel com NP TB foram de 3,68 % ($\pm 0,75$) e 3,66% ($\pm 0,71$), respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os hidrogéis nos tempos avaliados (Figura 11A).

Foi também avaliado o pH dos hidrogéis no momento da preparação e após 7 dias mantidos em DMEM-F12, 37°C, 5% CO₂. Constatou-se que a adição de NPs de titanato de bário ao hidrogel de alginato aumentou ($p < 0,05$) o pH tanto logo após a preparação como após a manutenção no meio de cultura por 7 dias. O pH do

hidrogel de alginato no momento da preparação foi 6,53, já o pH do hidrogel de alginato com NP TB foi 6,74. Já após 7 dias em meio de cultura foi 7,05 ($\pm 0,02$) e do hidrogel de alginato com NP TB, 7,16 ($\pm 0,01$) (Figura 11B).

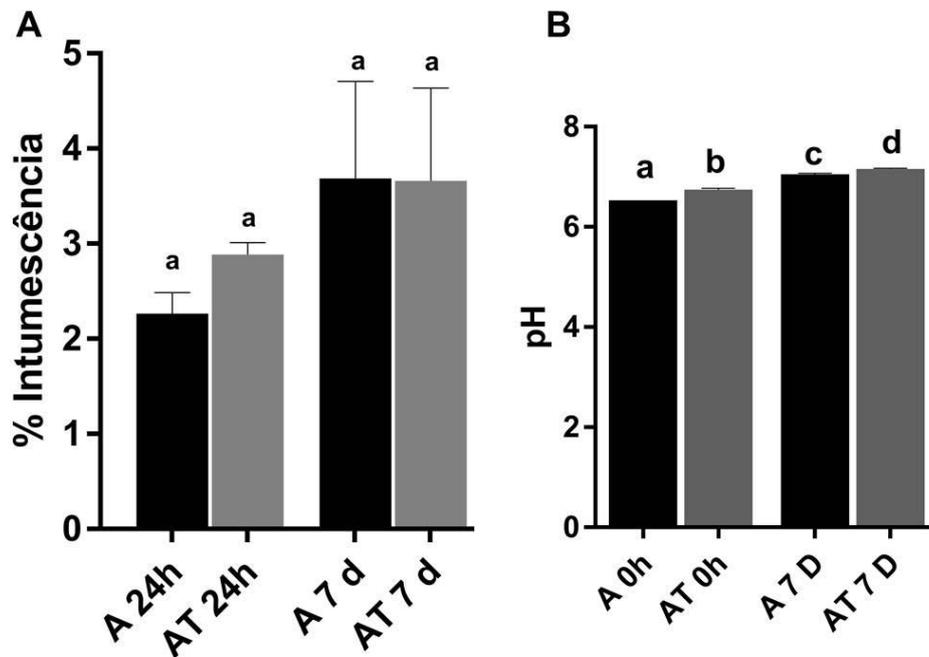


Figura 11: Avaliação da estabilidade dos hidrogéis de alginato e alginato com NP TB. (A) Percentual de intumescência e (B) pH dos hidrogéis. Letras diferentes mostram diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A: hidrogel de alginato. AT: hidrogel de alginato com NP TB.

3.4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 12 mostra a arquitetura dos hidrogéis produzidos. Nas figuras 12A, 12B e 12C são mostradas imagens dos hidrogéis de alginato com NP TB e nas imagens 12D, 12E e 12F dos hidrogéis de alginato. Foi possível observar que a adição de NP TB ao hidrogel aumentou a porosidade do mesmo.

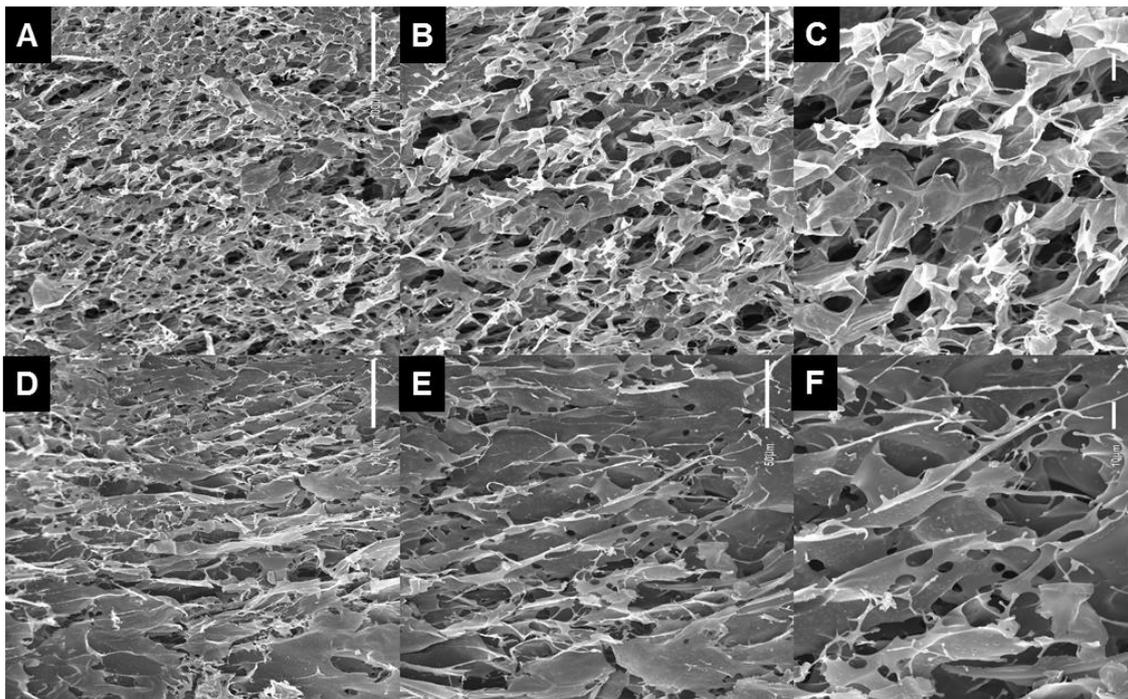


Figura 12: Arquitetura dos hidrogéis de alginato com NP TB (A, B e C) e alginato (D, E e F). Barra de escala: A e D: 100 μm , B e E: 50 μm e C e F: 10 μm . Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente.

3.4.5 AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS HIDROGÉIS

A Figura 13A, representa os resultados do ensaio de MTT de MSCs cultivadas com os hidrogéis de alginato e alginato com NP TB em dois tempos, 1 e 7 dias. O valor da absorbância é diretamente proporcional à proliferação celular. Em ambos os tempos de cultivo das MSCs não houve inibição significativa da proliferação celular quando as NP TB foram adicionadas ao hidrogel de alginato e durante os 7 dias de cultivo as células continuaram proliferando.

Na Figura 13B são mostrados os resultados do ensaio de SOD. Neste ensaio, a absorbância é inversamente proporcional ao estresse oxidativo. Em ambos os tempos de cultivo não houve diferença significativa na atividade da superóxido dismutase quando as NP TB foram adicionadas ao hidrogel de alginato.

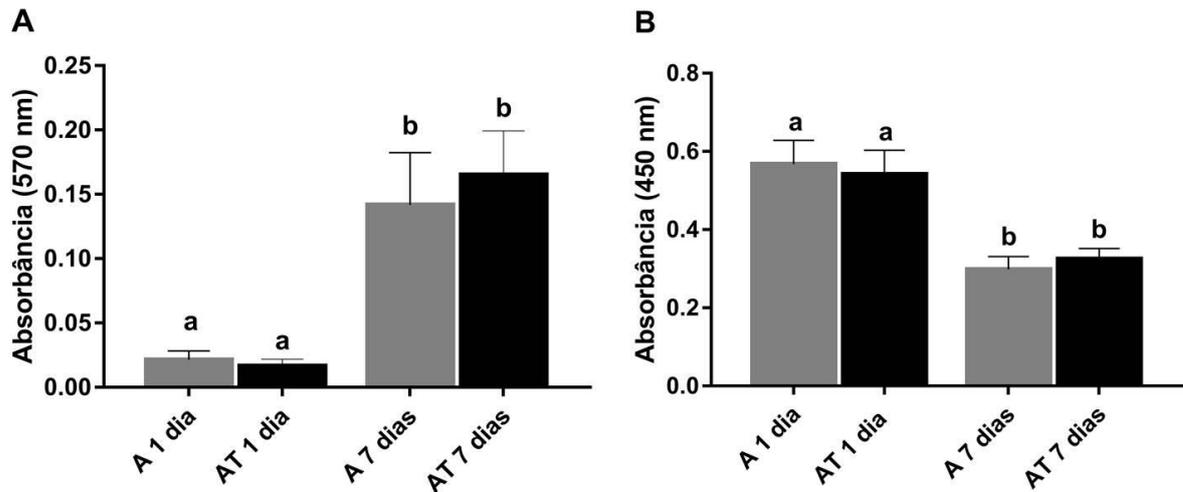


Figura 13: Avaliação da biocompatibilidade dos hidrogéis com MSCs. (A) Avaliação da proliferação celular por MTT e (B) avaliação do estresse oxidativo, pelo. Letras diferentes significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A: hidrogel de alginato. AT: hidrogel de alginato com NP TB.

3.4.6 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS

Após o cultivo das células-tronco com os hidrogéis, foi possível perceber mudança na morfologia celular. As células cultivadas nos hidrogéis de alginato com NPs de titanato de bário apresentaram morfologia estrelada, característica de células ósseas, mesmo na ausência de meio indutor de diferenciação óssea, como pode ser observado nas Figuras 14 e 15.

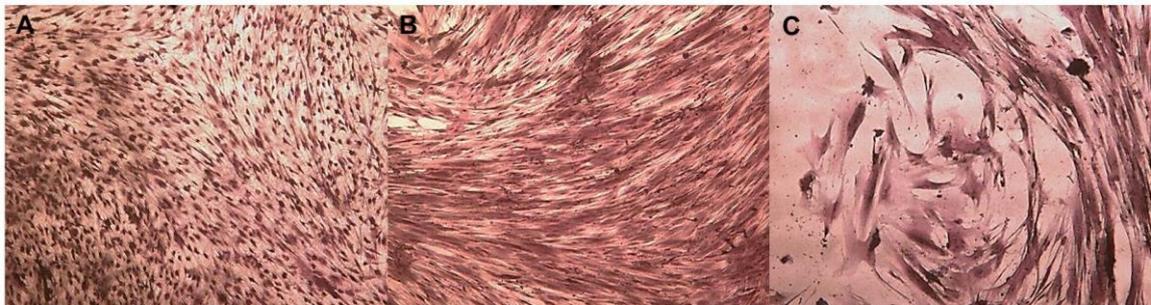


Figura 14: (A) Células-tronco mesenquimais humanas cultivadas em DMEM-F12, SFB (10%), antibiótico (1%), com (B) Hidrogel de alginato (3%) e (C) Hidrogel de alginato (3%), titanato de bário (0,1%). Aumento 40x.



Figura 15: Células-tronco mesenquimais humanas cultivadas com (A) Hidrogel de alginato (3%) e (B) Hidrogel de alginato (3%), titanato de bário (0,1%). Aumento 200x.

Para avaliar o potencial de indução de diferenciação osteogênica, foi analisada a expressão de genes relacionados com este processo. O nível de expressão de seus mRNAs foi avaliado por PCR em tempo real. O nível de mRNA após 7 e 21 dias de cultivo com os hidrogéis de alginato puro e alginato com NP TB. Ao comparar-se a expressão das células cultivadas com hidrogel de alginato com NP TB com a daquelas cultivadas com hidrogel de alginato puro, após 7 dias de cultivo houve aumento da expressão de *BMP-2* ($6,97 \pm 0,65$, $p=0,0012$) e diminuição de *BMP-4* ($0,195 \pm 0,01$, $p=0,001$) e *PtnRet* ($0,61 \pm 0,08$, $p=0,0025$). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na expressão de *ALP*. Após 21 dias de cultivo houve aumento na expressão de *BMP-2* ($2,95 \pm 1,06$, $p=0,001$) e *ALP* ($1,65 \pm 0,64$, $p=0,001$). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) na expressão de *BMP-4* e *PtnRet* (Figura 16).

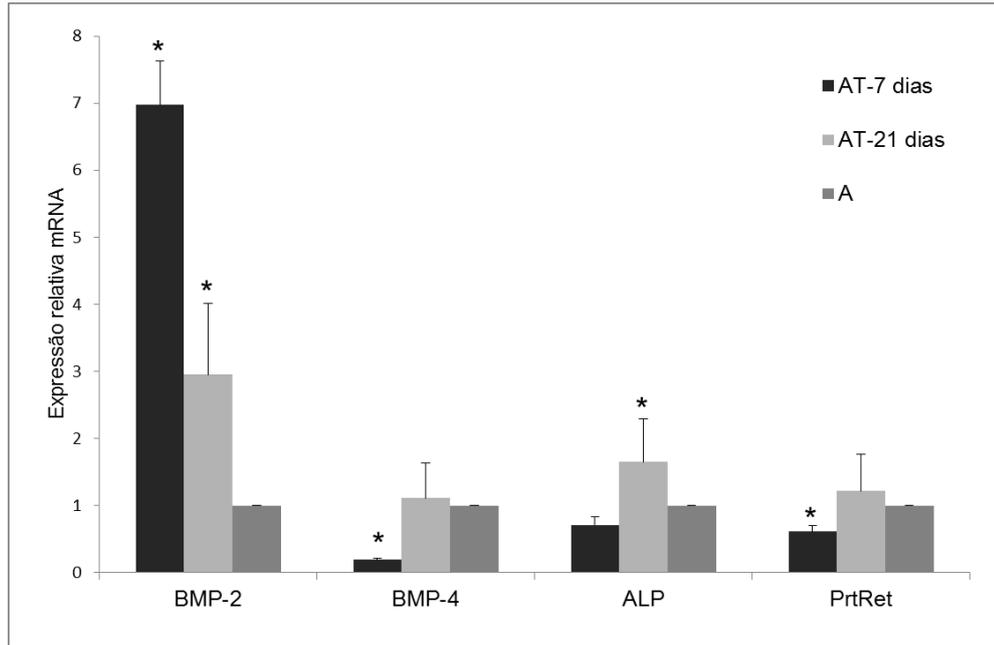


Figura 16: Nível de expressão gênica relativa de genes marcadores de diferenciação osteogênica. A significa hidrogel de alginato puro e AT hidrogel de alginato com NP TB. * significa que houve diferença estatística ($p < 0,001$).

3.5 DISCUSSÃO

A perda óssea na AR ocorre já nos estágios iniciais da doença. Tanto o osso cortical quanto o trabecular são afetados (MCINNES e SCHETT, 2017). O tratamento hoje disponível inclui medicamentos que amenizam as dores e impedem o avanço da doença (BURMESTER e POPE, 2017), mas não há um tratamento efetivo para a recuperação da matriz óssea já perdida. O uso de hidrogéis como biomaterial para suporte do crescimento celular, assim como para o estímulo da diferenciação de células-tronco em células ósseas é promissor e já se demonstrou que há um aumento na osteogênese quando há o uso desses biomateriais de diferentes composições (PADUANO et al., 2016; LIU et al., 2017).

Células respondem a estímulos químicos como hormônios, fatores de crescimento, mas também respondem a estímulos mecânicos como, por exemplo, rigidez, porosidade, tamanho de poros, pontos de adesão (TAN et al., 2014) e organização da superfície em que se encontram (DALBY et al., 2014). Por isso, a caracterização físico-química de biomateriais é de extrema importância antes de seu uso tanto para testes iniciais *in vitro*, como para aplicação *in vivo* (TAN et al., 2014).

A análise nos espectros Raman do alginato puro, NP TB e do hidrogel de alginato com NP TB foi feita (Figura 8). Em primeiro lugar, as vibrações de alongamento C-H aparecem como uma banda forte em alginato de sódio, enquanto é menos resolvido no hidrogel, localizado a 2.934 cm^{-1} . A deformação C-H é encontrada como um pico marcado em torno de 1.307 e 1.305 cm^{-1} , respectivamente. As amostras de compostos poliméricos apresentam as bandas de alongamento assimétricas características dos íons carboxilato (COO^-) a 1.651 e 1.617 cm^{-1} , revelando um maior grau de liberdade nos grupos C-H para a amostra de hidrogel em comparação com o alginato de sódio. Bandas na região entre 1.200 - 800 cm^{-1} podem ser atribuídas à deformação C-OH, C-C-H dobrando, C-O e C-C estimulando vibrações a partir do esqueleto de alginato. As bandas em 3227 e 1631 presentes no hidrogel de alginato estão ausentes no hidrogel com NP TB, sugerindo interação entre as NPs e as cadeias de alginato. As bandas características do titanato de bário foram sobrepostas por bandas de alginato, dificultando suas atribuições. A caracterização das bandas do hidrogel produzido é importante, pois

fornece suporte para a identificação futura de bandas pertencentes às células cultivadas nesses hidrogéis. Recentemente foi desenvolvido um método que utiliza espectroscopia Raman para caracterização bioquímica e morfológica de células cultivadas em hidrogéis (KALLEPITIS et al., 2017), sendo necessária a determinação precisa das bandas características do biomaterial, para diferenciá-lo das células.

As propriedades mecânicas do biomaterial podem influenciar a interação entre as células e o material utilizado, influenciando o crescimento e regeneração no caso do uso na bioengenharia de tecidos. Sabe-se que a interação das células com meio que a circunda é feita por proteínas transmembrana que se ligam ao citoesqueleto que está conectado ao núcleo, podendo modular a expressão gênica, influenciando no crescimento celular, diferenciação e apoptose (BRANDL et al., 2007; DALBY et al., 2014).

A análise reológica foi feita com os hidrogéis já gelificados com taxa de cisalhamento e temperatura constantes. Foram obtidos dados de viscosidade dos hidrogéis. Na reologia, viscoelasticidade é um termo aplicado a materiais que tem comportamento intermediário entre líquido e sólido (BRANDL et al., 2007). A viscosidade do alginato 1% em água (p/v), 25 ° C, pH 5-8, segundo dados do fabricante varia de 5 a 40 mPa·s. A viscosidade no início das medições dos hidrogéis a 3% foi de 366 mPa·s para o hidrogel de alginato puro e 397 mPa·s para o hidrogel de alginato com NP TB (Figura 9). O aumento da viscosidade durante o período de medições a cada 30 segundo a 37 ° C manteve padrão semelhante até os 40 minutos de medição, quando a viscosidade do hidrogel de alginato puro parou de aumentar e do hidrogel com NP TB continuou aumentando até o final da medição (60 minutos). A viscosidade mais baixa a temperatura baixa permite melhor manuseio dos hidrogéis para implantação. É interessante que a viscosidade aumente somente após a implantação (LARSEN et al., 2015). Demirtaş et al. (2017) produziram um hidrogel de alginato também a 3% (p/v) e um hidrogel com hidroxiapatita. A adição da hidroxiapatita também aumentou a viscosidade do hidrogel, como a adição de NP TB neste trabalho. O hidrogel de alginato com hidroxiapatita, com maior viscosidade, também aumentou a expressão de genes marcadores de diferenciação osteogênica.

Avaliando-se a viscosidade dos hidrogéis em conjunto os dados da espectroscopia Raman, é possível que a interação entre as NP TB e as cadeias de alginato tenham levado ao aumento da viscosidade observada.

O pH também é um importante parâmetro a ser avaliado visto que pH do microambiente onde encontram-se as MSCs é fundamental para osteogênese em biomateriais. Sabe-se que a osteogênese é favorecida em pH levemente alcalino (MONFOULET et al., 2014). O pH logo após a síntese dos hidrogéis de alginato puro e alginato com NP TB foi 6,53 para o primeiro e 6,74 para o segundo. Já após 7 dias em meio de cultura, foi 7,05 ($\pm 0,02$) e do hidrogel de alginato com NPs de titanato de bário, 7,16 ($\pm 0,01$) (Figura 11B). Nos dois tempos avaliados a combinação com NP TB aumentou de forma significativa o pH do hidrogel de alginato. A manutenção dos hidrogéis em condições mais próximas às fisiológicas permite uma melhor interação das células com o biomaterial e seu melhor crescimento. Monfoulet et al. (2014), avaliaram a influencia do pH na proliferação e diferenciação de MSCs. Os pesquisadores concluíram que o pH de 7,4-7,5 foi que propiciou melhores condições para a diferenciação osteogênica. Em pH acima de 8,2 houve morte celular. Além disso, os grupos funcionais presentes nos hidrogéis podem ser protonados ou desprotonados com a variação de pH o que pode influenciar na intumescência e taxa de degradação do hidrogel (DEBNATH et al., 2015). Hidrogéis de alginato com reticulação feita com Ca^{+2} perderam volume quando colocadas em pH baixo devido a perda de carga negativas da cadeia polimérica quando grupos carboxila são protonados (-COOH) (Li et al., 2011). Esta reticulação é feita devido à interação entre cátion multivalentes, como Ca^{+2} , e os grupos carboxila aniônicos (-COO⁻) nos resíduos G das cadeias de alginato (ZHANG et al., 2015). Portanto, em pH baixo a perda da carga negativa pode levar à desestabilização do hidrogel.

Outro parâmetro importante é o percentual de intumescência, que mede o aumento do volume polimérico quando em contato com solvente. Após 24 h da preparação os percentuais de intumescência do hidrogel de alginato puro e do hidrogel com NP TB foram de 2,35 % ($\pm 0,22$) e 2,92% ($\pm 0,12$), respectivamente. E após 7 dias da preparação, os percentuais de intumescência do hidrogel de alginato puro e do hidrogel com NP TB foram de 3,68 % ($\pm 0,75$) e 3,66% ($\pm 0,71$), respectivamente (Figura 11A). Não houve diferença ($p>0,05$) entre os hidrogéis nos tempos avaliados.

A intumescência está relacionada com distribuição de nutrientes para as células e vascularização do biomaterial (DA SILVA, 2009). A intumescência está diretamente relacionada com a porosidade. Maior porosidade permite maior permeação de nutriente e maior área superficial e, conseqüentemente, mais espaço para adesão celular. A adição de NP TB ao hidrogel de alginato aumentou a porosidade (Figura 12). A repulsão das NPs com carga de superfície idêntica leva à expansão da cadeia polimérica, podendo levar ao aumento da porosidade e intumescência (JAYARAMUDU et al., 2018). Materiais mais porosos mostraram-se mais eficientes na indução de diferenciação óssea. Utilizando um material de hidroxiapatita e titanato de bário com diferentes porosidades, Liu et al. (2016) observaram que houve maior atividade da ALP, um marcador de osteogênese, após 7 e 14 dias de cultura nas células cultivadas nos materiais porosos que naquelas cultivadas em material complemente denso.

Nos ensaios de biocompatibilidade, a adição de NP TB ao hidrogel de alginato não alterou a proliferação celular, avaliada pelo ensaio de MTT (Figura 13A) e nem aumentou o estresse oxidativo, avaliada pelo ensaio da atividade da SOD (Figura 13B).

Diversos trabalhos mostraram boa biocompatibilidade do titanato de bário em diferentes tipos de células como neuroblastoma (CIOFANI et al., 2010a), células H9C2 (CIOFANI et al., 2010b), células-tronco mesenquimais de ratos (CIOFANI et al., 2013), fibroblastos murinos (células L929) (ZHANG et al., 2014) e fibroblasto NIH3T3 (SERRA-GÓMEZ et al., 2016). Também foi avaliado pelo nosso grupo a biocompatibilidade com MSCs e foi demonstrado que as NP TB não causaram inibição da proliferação, aumento do estresse oxidativo e modificação da morfologia das MSCs.

Porém, também é necessário avaliar a biocompatibilidade de novas combinações de materiais, como no caso do hidrogel de alginato com NP TB desenvolvido neste trabalho. A combinação do titanato de bário com alguns biomateriais já foi feita com sucesso, demonstrando boa biocompatibilidade desses compósitos e, além disso, melhora da capacidade de indução de diferenciação osteogênica (LI et al., 2017). Serra-Gomez et al. (2016) produziram um hidrogel com NP TB de 200 nm e a adição destas NPs aumentou a viabilidade celular nos hidrogeis com 0,01, 0,05, 0,1, 5, 10 e 15% de poloxamina.

Além do TB, o uso de outras NPs com propriedades semelhantes à parte mineral da matriz extracelular óssea vem demonstrando ser uma forma para reforçar os biomateriais (DA SILVA e DREISS, 2016) e aumentar a capacidade de indução de diferenciação osteogênica. Para essa indução já foram utilizadas NP de titanato de cálcio, titanato de estrôncio (BAGCHI et al., 2014) e hidroxiapatita (BEHERA et al., 2017).

Utilizando a coloração de *Von Kossa* para avaliar a diferenciação das MSCs cultivadas com hidrogéis de alginato com NP TB, foi possível perceber mudança na morfologia celular após o período de 21 dias de cultivo. As células cultivadas na presença de NP TB apresentaram morfologia poligonal, com citoplasma espalhado, características morfológicas típicas de osteoblastos (Figuras 14 e 15).

A expressão de genes marcadores de diferenciação osteogênica avaliada por PCR em tempo real corroborou os resultados da morfologia celular (Figura 16). O processo de osteogênese é um processo biológico complexo que envolve a regulação da expressão de genes marcadores de osteoblastos e é um processo regulado de forma dependente do tempo. Primeiro há um estágio de alta proliferação celular, seguindo pela inibição da proliferação, quando as células começam a investir energia na secreção de matriz extracelular, seguida pela deposição de cálcio (STEIN e LIAN, 1993; CHOI et al., 2011). Os genes *BMP-2*, *BMP-4*, *ALP* são marcadores para diferenciação óssea e *PtnRet* está relacionado ao ciclo celular.

A BMP-2 é uma citocina conhecida por desempenhar um papel fundamental na indução da diferenciação osteogênica. Atualmente é o único fator de crescimento aprovado pela agência que controla liberação de drogas para uso humano nos Estados Unidos (FDA) para o uso na enxertia óssea. A BMP-2 induz o fator de transcrição relacionado à Runt (*Runx-2*) e mantém sua acetilação (KOLF et al., 2007). *Runx-2* é o maior responsável pela programação celular para a diferenciação em osteoblastos (JAMES et al., 2016). A ALP também é estimulada pela BMP-2 (CHENG et al., 2003; RYOO et al., 2006). Em relação às células cultivadas somente com hidrogel de alginato, houve aumento da expressão da *BMP-2* nas células cultivadas com NP TB no dia 7 e houve uma diminuição de 42% na expressão no dia 21, mas apesar disso o nível continuou mais alto que o cultivo feito

somente com hidrogel de alginato ($p < 0,001$). Utilizando MSCs do ligamento periodontal, Choi et al. (2011) encontram um padrão semelhante de expressão de *BMP-2*, havendo maior expressão no dia 7 de cultura e diminuição de 12% no dia 21.

A ALP é um componente chave das vesículas secretadas pelos osteoblastos e um dos melhores marcadores de diferenciação e mineralização (BAO et al., 2016). Ela é uma enzima ligada à membrana envolvida na preparação da matriz extracelular óssea para deposição mineral (BAGCHI et al., 2014). A expressão de *ALP* pelas células cultivadas com NP TB foi significativamente maior ($p < 0,001$) após 21 dias de cultivo. A expressão e atividade de ALP são parâmetros largamente utilizados para avaliar a diferenciação osteogênica. A expressão da APL está relacionada com processo de desenvolvimento e maturação da matriz extracelular em cultura, começando a aumentar o nível de expressão por volta do 11º dia de cultivo e até o 21º dia (STEIN et al., 1993). Choi et al. (2011) observaram o aumento de *ALP* após 21 dias de cultivo de MSCs em meio indutor. Utilizando um material funcionalizado com NP TB, Li et al. (2017) observaram a atividade de APL aumentada em relação ao material não funcionalizado após 21 dias de cultivo celular.

Em relação ao *BMP-4* houve menor expressão ($p < 0,001$) nas células cultivadas por 7 dias com hidrogel com NP TB do que no hidrogel puro e não houve diferença estatística no dia 21. Apesar de Choi et al. (2011) relatarem o aumento a expressão de *BMP-4* em MSCs, neste trabalho houve diminuição da sua expressão. Cheng et al. (2003) avaliaram a atividade osteogênica de 14 BMPs. Os autores concluíram que a *BMP-4* não apresentou eficiência na indução da atividade osteogênica em MSCs. A *BMP-4* mostrou-se eficiente no aumento da indução da atividade osteogênica em células osteoprogenitoras, evidenciando que a resposta a BMPs é dependente do tipo celular. Da mesma forma, Sammons et al. (2004) não observaram efeito da *BMP-4* no aumento de osteocalcina e nem da atividade da ALP.

A PtnRet faz parte da via de controle o ciclo celular na transição da fase G1 para S. A PtnRet tem papel na diferenciação osteogênica. O Runx-2 interage fisicamente com a PtnRet, o que leva a inibição da proliferação celular e ativação de genes relacionados a diferenciação. Segundo Thomas et al. (2001) a PtnRet tem

papel importante principalmente no estágio tardio de diferenciação. A expressão de *PtnRet* nas células cultivadas por 7 dias com hidrogel de alginato com NP TB foi menor ($p < 0,001$) que naquelas cultivadas com hidrogel de alginato puro. Não houve diferença significativa após 21 dias de cultivo.

Em conjunto os dados da análise de expressão gênica indicam que a adição de NP TB ao hidrogel de alginato, promoveu a diferenciação osteogênica de MSCs. As NP TB são capazes de induzir e/ou aumentar a diferenciação osteogênica (GENCHI et al., 2016). Diversos trabalhos relataram o uso de TB com objetivo de induzir a diferenciação osteogênica (CIOFANI et al., 2013; ZHANG et al., 2014; LI et al., 2017).

Sabe-se que a interação das células com o meio que a circunda é feita por proteínas transmembranas que se ligam ao citoesqueleto que está conectado ao núcleo, podendo modular a expressão gênica, influenciando no crescimento celular, diferenciação e apoptose (BRANDL et al., 2007; DALBY et al., 2014).

Estruturas em escala nanométricas têm tamanho semelhante a receptores e podem modular a resposta celular (DALBY et al., 2014) influenciando na adesão, proliferação, diferenciação e morte (KREIS e VALE, 1999; CAVALCANTI-ADAM et al., 2008; SCHVARTZMAN et al., 2011). A adição de TB em filmes de poly(vinylidene-trifluoroethylene) aumentou o espalhamento do citoplasma de células osteobásticas logo após 30 minutos do plaqueamento. Após 24 horas o número de células aderidas foi maior e também houve maior produção de ALP em comparação com filmes sem TB (BELOTI et al., 2006). Teixeira et al. (2010) utilizaram o mesmo filme para o cultivo de fibroblastos do ligamento periodontal, obtendo resultados semelhantes, concluindo que a adição de TB favoreceu a adesão, proliferação e diferenciação celular. Demirtaş et al. (2017) adicionaram hidroxiapatita ao hidrogel de alginato também aumentou o espalhamento das células. Nossos resultados sugerem que adição de NP TB ao hidrogel de alginato proporcionou mais pontos de adesão para as MSCs, isso pode ter aumentado o potencial de indução de diferenciação do hidrogel.

Devido a sua piezoelectricidade, o TB é uma das cerâmicas mais estudadas para uso na engenharia de tecido ósseo. Tal propriedade tem potencial para ser usada como uma fonte de carga, mimetizando o estresse gerado naturalmente pelo deslizamento das fibras de colágeno (ZHANG et al., 2014) e

potencialmente tem a capacidade de formar dipolo elétrico e atrair íons de cálcio e fosfato, ajudando na formação óssea.

Outros trabalhos utilizaram, com sucesso, cerâmicas piezoelétricas combinadas com polímeros com objetivo de induzir a diferenciação osteogênica. Bagchi et al. (2014) utilizaram NP TB combinadas com meio de cultura com agentes indutores de diferenciação, já Li et al. (2017) observaram aumento na diferenciação osteogênica *in vitro* utilizando somente o biomaterial, sem necessidade do uso de indutores químicos. Do ponto de vista da aplicação do biomaterial, é interessante que o mesmo seja capaz de induzir a diferenciação sem a necessidade do uso de indutores químicos.

Neste trabalho foi produzido com sucesso um hidrogel de alginato com NP TB. A adição de NP TB aumentou a porosidade, a viscosidade e, possivelmente, proporcionou mais pontos de adesão para as MSCs. Além disso, o biomaterial produzido apresentou boa biocompatibilidade uma vez que a adição de NP TB não alterou a proliferação celular e não aumentou o estresse oxidativo. Pela primeira vez, a nosso conhecimento, NP TB foram combinadas com hidrogel de alginato e foi feita a avaliação da capacidade de indução de diferenciação osteogênica. O nanobiocompósito produzido aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, mesmo na ausência de meio de cultura indutor de diferenciação.

3.6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi produzido com sucesso um hidrogel de alginato com NP TB. O biomaterial produzido apresentou biocompatibilidade com células tronco mesenquimais humanas. A adição de NP TB não alterou a proliferação celular, não aumentou o estresse oxidativo e aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, mesmo na ausência de indutores químicos de diferenciação. Neste contexto, os dados de expressão de marcadores de diferenciação osteogênica são corroborados com alterações morfológicas celulares.

3.7 PERSPECTIVAS

- Incorporar e avaliar *in vitro* a taxa de liberação do anticorpo anti-IL-1 β -scFab pelo hidrogel alginato com NP TB;
- Avaliar *in vivo* a biocompatibilidade do nanobiocompósito de alginato com NP TB;
- Avaliar *in vivo* o potencial de indução formação óssea do nanobiocompósito de alginato com NP TB.

3.8 REFERÊNCIAS

ARMIENTO, A. R.; EGLIN, D., STODDART, M. J. The stimulatory effect of retinoblastoma protein on alkaline phosphatase activity and mineralisation of human mesenchymal stromal cells. *The Bone & Joint Journal*, v. 99, p. 117-117, 2017.

ABBAH, S. A.; LU, W. W.; CHAN, D.; CHEUNG, K. M. C.; LIU, W. G.; ZHAO, F.; LUK, K. D. K. In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 347, n.1, p. 185-191, 2006.

BAGCHI, A.; MEKA, S. R. K.; RAO, B. N.; CHATTERJEE, K. Perovskite ceramic nanoparticles in polymer composites for augmenting bone tissue regeneration. *Nanotechnology*, v. 25, n.48, 2014.

BAO, M.; WANG, X.; YUAN, H.; LOU, X.; ZHAO, Q.; ZHANG, Y. HAp incorporated ultrafine polymeric fibers with shape memory effect for potential use in bone screw hole healing. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, n. 31, p. 5308-5320, 2016.

BEHERA, S.; NASKAR, D.; SAPRU, S.; BHATTACHARJEE, P.; DEY, T.; GHOSH, A. K.; KUNDU, S. C. Hydroxyapatite reinforced inherent RGD containing silk fibroin composite scaffold : Promising platform for bone tissue engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 13, p. 1745–1759, 2017.

BELOTI M. M.; DE OLIVEIRA P. T.; GIMENES R.; ZAGHETE M. A.; BERTOLINI M. J.; ROSA A.L. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*, v. 79, p. 282–288, 2006.

BRANDL, F.; SOMMER, F.; GOEPFERICH, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, v. 28, n. 2, p. 134-146, 2007.

BURMESTER, G. R.; POPE, J. E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p. 2338-2348, 2017.

CAVALCANTI-ADAM, E. A.; AYDIN, D.; HIRSCHFELD-WARNEKEN, V. C.; SPATZ, J. P. Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location. *HFSP Journal*, v. 2, p. 276–285, 2008.

CIOFANI. G; DANTI, S.S; D'ALESSANDRO,D; MOSCATO, S; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy, *Nanoscale Research Letters*, v. 5, n. 7, p. 1093–1101, 2010a.

CIOFANI, G.; DANTI, S.; MOSCATO, S.; ALBERTAZZI, L.; D'ALESSANDRO, D.; DINUCCI, D.; CHIPELLINI, F.; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: potential applications in biomedicine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, n. 2, p. 535-543, 2010b.

CIOFANI, G.; RICOTTI, L.; CANALE, C.; D'ALESSANDRO, D.; BERRETTINI, S.; MAZZOLAI, B.; MATTOLI, V. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.102, p. 312-320, 2013.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *International journal of pharmaceutics*, v. 242, n. 1, p. 259-262, 2002.

CHANG, S. C. N.; CHUANG, H.; CHEN, Y. R.; YANG, L. C.; CHEN, J. K.; MARDINI, S.; LOU, J. Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells 1. *Journal of Surgical Research*, v. 119, n. 1, p. 85-91, 2004.

CHANG, S. C. N.; CHUNG, H. Y.; TAI, C. L.; CHEN, P. K. T.; LIN, T. M.; JENG, L. B. Repair of large cranial defects by hBMP-2 expressing bone marrow stromal cells: Comparison between alginate and collagen type I systems. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 94, n. 2, p. 433-441, 2010.

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F. M.; HAYDON, R. C.; PENG, Y.; ZHOU, L.; SZATKOWSKI, J. P. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Journal of Bone and Joint Surgery*, v. 85, n. 8, p. 1544-1552, 2003.

CHOI, M. H.; NOH, W. C.; PARK, J. W.; LEE, J. M.; SUH, J. Y. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of periodontal & implant science*, v. 41, n. 4, p.167-175, 2011.

Da SILVA, E. E.; DELLA COLLETA, H. H.; FERLAUTO, A. S.; MOREIRA, R. L.; RESENDE, R. R.; OLIVEIRA, S.; LADEIRA, L. O. Nanostructured 3-D collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffold . *Nano Research*, v. 2, n. 6, p. 462-473, 2009.

Da SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites: nanoparticles to tune gel properties. *Polymer International*, v. 65, n. 3, p. 268-279, 2016.

DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; TARE, R.; ANDAR, A.; RIEHLE, M. O.; HERZYK, P.; OREFFO, R. O. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature materials*, v. 6, n. 12, p. 997-1003, 2007.

DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R. O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature materials*, v.13, n. 6, p. 558-569, 2014.

DEBNATH, T.; GHOSH, S.; POTLAPUVU, U. S.; KONA, L.; KAMARAJU, S. R.; SARKAR, S.; CHELLURI, L. K. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived stem cells grown on chitosan hydrogel. *PloS one*, v. 10, n. 3, 2015.

DEMIRTAŞ, T. T.; IRMAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *BioFabrication*, v. 9, n. 3, 2017.

FINOTELLI, P. V.; DA SILVA, D.; SOLA-PENNA, M.; ROSSI, A. M.; FARINA, M.; ANDRADE, L. R.; ROCHA-LEÃO, M. H. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 81, n. 1, p. 206-211, 2010.

FUJI, T.; ANADA, T.; HONDA, Y.; SHIWAKU, Y.; KOIKE, H.; KAMAKURA, S.; SUZUKI, O. Octacalcium phosphate-precipitated alginate *scaffold* for bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, n. 11, p. 3525-3535, 2009.

GENCHI, G. G.; MARINO, A.; ROCCA, A.; MATTOLI, V.; CIOFANI, G. Barium titanate nanoparticles: promising multitasking vectors in nanomedicine. *Nanotechnology*, v. 27, n. 23, 2016.

HWANG, Y. S.; CHO, J.; TAY, F.; HENG, J. Y.; HO, R.; KAZARIAN, S. G.; MANTALARIS, A. The use of murine embryonic stem cells, alginate encapsulation, and rotary microgravity bioreactor in bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 30, n. 4, p. 499-507, 2009.

INGBER, D. E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *The FASEB journal*, v. 20, n. 7, p. 811-827, 2006.

JIAO, H.; ZHAO, K.; BIAN, T.; TANG, Y. Hydrothermal synthesis and properties characterization of barium titanate/hydroxyapatite spherical nanocomposite materials. *Journal of Alloys and Compounds*, v.715, p. 73-82, 2017.

JAMES, A. W.; LACHAUD, G.; SHEN, J.; ASATRIAN, G.; NGUYEN, V.; ZHANG, X SOO, C. A review of the clinical side effects of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 22, n. 4, p. 284-297, 2016.

JAYARAMUDU, T.; VARAPRASAD, K.; SADIKU, E. R.; KIM, H. C.; KIM, J. Preparation of antibacterial temperature-sensitive silver-nanocomposite hydrogels from N-isopropylacrylamide with green tea. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 135, n.4, 2018.

KALLEPITIS, C.; BERGHOLT, M. S.; MAZO, M. M.; LEONARDO, V.; SKAALURE, S. C.; MAYNARD, S. A.; STEVENS, M. M. Quantitative volumetric Raman imaging of three dimensional cell cultures. *Nature Communications*, v. 8, 2017.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*, v. 9, n. 1, 2007.

KREIS, T.; R. VALE. Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor and Adhesion Proteins. 2. Ed. Oxford University Press, 1999.

LARSEN, B. E.; BJØRNSTAD, J.; PETTERSEN, E. O.; TØNNESEN, H. H.; MELVIK, J. E. Rheological characterization of an injectable alginate gel system. *BMC biotechnology*, v. 15, n. 1, 2015.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LEE, A. L.; NG, V. W.; GAO, S., HEDRICK, J. L.; YANG, Y. Y. Injectable hydrogels from triblock copolymers of vitamin e-functionalized polycarbonate and poly (ethylene glycol) for subcutaneous delivery of antibodies for cancer therapy. *Advanced Functional Materials*, v. 24, n. 11, p. 1538-1550, 2014.

LEIJTEN, J.; SEO, J.; YUE, K.; TRUJILLO-DE SANTIAGO, G.; TAMAYOL, A.; RUIZ-ESPARZA, G. U.; ZHANG, Y. S. Spatially and temporally controlled hydrogels for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, v. 119, p. 1-35, 2017.

LI, Y.; HU, M.; DU, Y.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Control of lipase digestibility of emulsified lipids by encapsulation within calcium alginate beads. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 1, p. 122-130, 2011.

LI, Y.; DAI, X.; BAI, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; LIU, O.; DENG, X. Electroactive BaTiO₃ nanoparticle-functionalized fibrous scaffold enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4007–4018, 2017.

LIU, B.; CHEN, L.; SHAO, C.; ZHANG, F.; ZHOU, K.; CAO, J.; ZHANG, D. Improved osteoblasts growth on osteomimetic hydroxyapatite/BaTiO₃ composites with aligned lamellar porous structure. *Materials Science and Engineering: C*, v. 61, p. 8-14, 2016.

LIU, M.; ZENG, X.; MA, C.; YI, H.; ALI, Z.; MOU, X; SONG LI; YAN DENG.; HE, N. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone research*, v. 5, 2017.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p.2328-2337, 2017.

MCMURRAY, R. J.; GADEGAARD, N.; TSIMBOURI, P. M.; BURGESS, K. V.; MCNAMARA, L. E.; TARE, R., KINGHAM; E., OREFFO, R. O. C.; DALBY, M. J. Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nature materials*, v. 10, n. 8, p. 637-644, 2011.

MONFOULET, L. E.; BECQUART, P.; MARCHAT, D.; VANDAMME, K.; BOURGUIGNON, M.; PACARD, E.; LOGEART-AVRAMOGLOU, D. The pH in the microenvironment of human mesenchymal stem cells is a critical factor for optimal osteogenesis in tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering Part A*, v. 20, n. 13-14, p. 1827-1840, 2014.

Sociedade Brasileira de Reumatologia. Novas Diretrizes de Tratamento para Artrite Reumatoide (AR). 2017. <https://www.reumatologia.org.br/noticias/novas-diretrizes-de-tratamento-de-artrite-reumatoide-da-sociedade-brasileira-de-reumatologia/>.

Acessado em 03 de janeiro de 2018.

OLDERØY, M. Ø.; XIE, M.; ANDREASSEN, J. P.; STRAND, B. L.; ZHANG, Z.; SIKORSKI, P. Viscoelastic properties of mineralized alginate hydrogel beads. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 23, n. 7, p. 1619-1627, 2012.

PADUANO, F.; MARRELLI, M.; WHITE, L. J.; SHAKESHEFF, K. M.; TATULLO, M. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydrogel scaffold derived from decellularized bone extracellular matrix and collagen type I. *PloS one*, v. 11, n. 2, 2016.

PFAFFL M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 9, 2002.

PINA, S.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review. *Advanced Materials*, v. 27, n. 7, p. 1143-1169, 2015.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letter*, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

REAKASAME, S.; BOCCACCINI, A. R. Oxidized alginate based hydrogels for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules*, 2017.

RYOO, H. M.; LEE, M. H.; KIM, Y. J. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, v. 366, n. 1, p. 51-57, 2006.

SAMMONS, J.; AHMED, N.; EL-SHEEMY, M.; HASSAN, H. T. The Role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in Mesenchymal Stem Cell–Dependent Bone Development: Effects on Osteoblastic Differentiation Induced by Parathyroid Hormone and Vitamin D3. *Stem cells and development*, v. 13, n. 3, p. 273-280, 2004.

SERRA-GÓMEZ, R.; DREISS, C. A.; GONZALEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-GAITANO, G. Structure and Rheology of Poloxamine T1107 and its Nanocomposite Hydrogels with Cyclodextrin-Modified Barium Titanate Nanoparticles. *Langmuir*, 2016.

SCHVARTZMAN, M.; PALMA, M.; SABLE, J.; ABRAMSON, J.; HU, X.; SHEETZ, M. P.; WIND, S. J. Nanolithographic control of the spatial organization of cellular adhesion receptors at the single-molecule level. *Nano letters*, v. 11, n. 3, p. 1306-1312, 2011.

SHOKROLLAHI, H.; SALIMI, F.; DOOSTMOHAMMADI, A. The Fabrication and characterization of barium titanate/akermanite nano-bio-ceramic with a suitable piezoelectric coefficient for bone defect recovery. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, v. 74, p. 365-370, 2017.

STEIN, G. S; LIAN, J. B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine reviews*, v. 14, n. 4, p. 424-442, 1993.

TAN, S.; FANG, J. Y.; YANG, Z.; NIMNI, M. E.; HAN, B. The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. *Biomaterials*, v. 35, n. 20, p. 5294-5306, 2014.

TEIXEIRA, L. N.; CRIPPA, G. E.; TRABUCO, A. C.; GIMENES, R.; ZAGHETE, M. A.; PALIOTO, D. B.; BELOTI, M. M. In vitro biocompatibility of poly (vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate composite using cultures of human periodontal ligament fibroblasts and keratinocytes. *Acta biomaterialia*, v. 6, n. 3, p. 979-989, 2010.

THOMAS, D. M.; CARTY, S. A.; PISCOPO, D. M.; LEE, J. S.; WANG, W. F.; FORRESTER, W. C.; HINDS, P. W. The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Molecular Cell*, v. 8, n. 2, p. 303-316, 2001.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules*, v. 72, p. 269-281, 2015.

ZHAO, L.; WEIR, M. D.; XU, H. H. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 25, p. 6502-6510, 2010.

ZHANG, Y.; CHEN, L.; ZENG, J.; ZHOU, K.; ZHANG, D.. Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, v. 39, p. 143-149, 2014.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; CHEN, L.; TONG, Q.; MCCLEMENTS, D. J. Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. *European Polymer Journal*, v. 72, p. 698-716, 2015.

ZHU, S.; ZHANG, T.; SUN, C.; YU, A.; QI, B.; CHENG, H. Bone marrow mesenchymal stem cells combined with calcium alginate gel modified by hTGF- β 1 for the construction of tissue-engineered cartilage in three-dimensional conditions. *Experimental and therapeutic medicine*, v.5, n. 1, p. 95-101, 2013.

4 CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E POTENCIAL DE INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA E NANOPARTÍCULAS DE TITANATO DE BÁRIO

4.1 INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (ECM) é uma rede de proteínas e polissacarídeos que interagem com as células residentes e influenciam na migração, proliferação e diferenciação celular, sendo fundamental para a manutenção da integridade estrutural e mecânica de tecidos e órgãos. Há um equilíbrio dinâmico entre a ECM e as células residentes do tecido. A ECM sofre remodelamento em resposta a mudanças ambientais e a danos em tecidos. Geralmente a ECM é conservada entre as espécies, possibilitando seu uso para transplante xenólogos (STERN et al., 2009; CHENG et al., 2014).

Diversos produtos que consistem de ECM descelularizada já estão disponíveis comercialmente. Há produtos derivados da pele humana, pele suína, pele bovina, bexiga suína, intestino delgado suíno, pericárdio humano, equino e bovino e ainda válvula cardíaca de suínos (CRAPO et al., 2011).

Muitos componentes são comuns entre as ECM de diferentes tecidos e cada uma tem constituintes exclusivos necessários ao tipo celular que a compõem (STERN et al., 2009). A ECM óssea se diferencia de todas as outras matrizes que compõem os demais tecidos corporais principalmente pela sua constituição predominantemente mineral, é considerada um tecido micro- e nano-compósito (HENKEL et al., 2013). Cerca de 70 a 90% da matriz óssea é composta por mineral e o restante é composto por material orgânico, como por exemplo, proteínas (BUCKWALTER et al., 2005; SROGA et al., 2011; HENKEL et al., 2013). Da parte orgânica, 90% é colágeno tipo I, IV e XII (TRIFFIT, 1980) e os outros 10% proteoglicanos (PG), glicoproteínas, osteocalcina, osteonectina e sialoproteínas de osso (BOSKEY, 1989; WENDEL et al., 1998).

O colágeno é a proteína mais abundante em mamíferos, correspondendo a um terço do peso das proteínas corporais. Todos os membros da família de colágeno contêm domínios com sequências de aminoácidos de repetição G-X-Y, onde G é glicina, e X e Y principalmente, resíduos de prolina e hidroxiprolina, respectivamente (FERREIRA et al., 2012).

Segundo Robey (2002), existem diversas proteínas na ECM óssea que ligam-se ao colágeno, formando pequenas fibras. O colágeno pode servir de suporte que orienta os nucleadores no processo de cristalização da hidroxiapatita. Tais nucleadores são provavelmente, outros componentes da ECM orgânica.

Fatores de crescimento e citocinas, tais como o fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator de crescimento insulínico (IGF), osteoprotegerina (OPG), interferon- γ , fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs 2-10), além de PGs também estão presentes em pequenas quantidades na ECM óssea. Esses fatores são importantes na regulação da diferenciação, ativação e crescimento celular (MARCUS et al., 2009).

Em relação às células contidas na ECM óssea mineralizada, existem quatro tipos: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células de revestimento ósseo. Os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea e os osteoclastos pela sua reabsorção.

A relação entre todos estes componentes da matriz extracelular óssea não é constante, varia de acordo com a idade e também é espécie-específica (VENKATESAN et al., 2015)

Ao contrário dos outros tecidos humanos, o osso é capaz de se regenerar verdadeiramente, ou seja, sem a formação de cicatriz fibrosa. Durante o processo de regeneração são ativados mecanismos de desenvolvimento ósseo embrionário. Apesar desta grande capacidade de regeneração, 5 a 10% das fraturas são propensas a não-união óssea. Tal situação ocorre principalmente em traumas extensos e retirada de tecido ósseo devido a tumores (HENKEL et al., 2013).

Há relatos de uso de substitutos de perda óssea que datam de 4 mil anos. Arqueólogos encontraram peças de ouro no crânio de um chefe tribal do Peru, além de substitutos feitos de conchas, prata, ferro e do fruto cabaça em outras regiões (HENKEL et al., 2013). Atualmente o transplante ósseo é o segundo mais comum

(FRÖHLICH et al., 2010; HENKEL et al., 2013), alcançando 3,5 milhões de cirurgias por ano.

Atualmente transplante ósseo a técnica mais utilizada ainda é o uso de enxertos autólogos, pois os mesmos têm capacidade osteocondutiva, proporcionando um biomaterial para o crescimento de células; osteoindutiva, promovendo a diferenciação de células-tronco em células ósseas e osteogênica, pois possuem células viáveis capazes de formar o novo tecido ósseo. Limitações do procedimento incluem a limitada disponibilidade de enxerto e o fato de ser necessário um segundo procedimento cirúrgico para coleta do enxerto (HENKEL et al., 2013).

Por isso, buscam-se alternativas para fontes de enxertos ósseos. Em 1965, Urist utilizou pela primeira vez ECM óssea desmineralizada para transplantes xenólogos e alógenos e avaliou a eficiência da osteoindução. A utilização de ECM óssea desmineralizada mostrou-se mais eficiente que o uso de osso calcificado. Desde então buscou-se aperfeiçoar as técnicas de desmineralização, cirúrgicas, desenvolvimento de materiais bioativos e matérias combinados com células e fatores de crescimento (HENKEL et al., 2013).

O mecanismo pelo qual o processo de remodelamento do enxerto ocorre é conhecido e envolve recrutamento de células progenitoras, promoção da proliferação e migração, angiogênese no local do enxerto, promoção do fenótipo favorável M2 de macrófagos durante a interação do tecido do receptor e o biomaterial (SAWKINS et al., 2013)

O processo de desmineralização é importante, pois sabe-se que o fosfato de cálcio pode causar reação inflamatória após o transplante (HENKEL et al., 2013). Além da desmineralização, a descelularização também vem sendo utilizada para produção de biomaterial (BROWN et al., 2009).

Diversas técnicas e agentes químicos, biológicos e físicos são utilizadas na descelularização de tecidos e até órgãos inteiros (CRAPO, GILBERT e BADYLAK, 2011). Dentre os agentes químicos, podem ser utilizados ácidos, bases, soluções hipo ou hipertônicas, detergentes, álcool e outros solventes como acetona e fosfato de tributila. Dentre os agentes biológicos podem ser usadas enzimas como nucleases, tripsina, colagenase, α -galactosidase, principalmente em tecidos xenógenos, para eliminar o epítipo Gal, não presente em humanos. Ou agentes não

enzimáticos como agentes quelantes, EDTA e EGTA. Podem ser utilizados também agente físicos como variação de temperatura, pressão e eletroporação (CRAPO, et al., 2011).

Diversos produtos derivados de ECM óssea já estão disponíveis para venda no mercado em forma de pó, massa, discos, gel, descelularizados desmineralizados e descelularizados, assim como os componentes da ECM secretados em cultura de células para enriquecimento de biomateriais (GREENWALD et al., 2006; AMINI et al., 2012; CHENG et al., 2014; SWINEHART e BADYLAK, 2016).

O uso de hidrogéis de ECM desmineralizada já foi feito, demonstrando aumento da proliferação celular *in vitro* (SAWKINS et al., 2013; PADUANO et al. 2016).

O uso de colágeno na engenharia de tecidos é interessante, pois é biocompatível, biodegradável, mostra baixa imunogenicidade e favorece a adesão e proliferação celular (GUILLE et al., 2005). Sendo colágeno o componente majoritário da parte orgânica da ECM óssea, métodos que possibilitam a desmineralização e conservem o colágeno e outras proteínas da ECM, permitem a formação de um hidrogel natural com possível capacidade de induzir a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células ósseas.

Há dois tipos de ossos, o cortical e o trabecular. O osso trabecular é o mais utilizado para descelularização, pois é mais poroso, o que facilita seu manejo e remoção das células (CHENG et al., 2014). Alguns trabalhos já demonstraram a utilização de hidrogéis derivados de ECM óssea como biomaterial, *in vivo*, para mineralização tecidual e formação óssea (GOTHARD et al., 2015) e, *in vitro*, com a capacidade de estimular a diferenciação odontogênica de células-tronco (PADUANO et al., 2016) e osteogênica de células C2C12 e da calvária de camundongos (ALOM et al., 2017). Além disso, também já foram utilizados como veículos para liberação de fatores osteogênicos (SMITH et al., 2014a; SMITH et al., 2014b), demonstrando seu potencial como veículos para outros fatores, como anticorpos.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um hidrogel de ECM com NP TB para o potencial tratamento da perda óssea na artrite reumatoide.

4.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir um hidrogel de ECM com NP TB;
- Fazer a caracterização físico-química do hidrogel;
- Avaliar a biocompatibilidade do hidrogel com MSCs;
- Avaliar o potencial osteogênico do hidrogel.

4.3 MATERIAS E MÉTODOS

4.3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da pró-reitoria de pesquisa da UFJF sob protocolo 031/2014.

4.3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Clorofórmio, metanol e etanol (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil), tripsina 0,25%, DMEM-Low Glicose (LG), antibiótico (100 UI mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina, soro bovino fetal, tampão fosfato-salino (PBS), Easy Taq DNA Polymerase (LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil), marcador de massa lambda (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), kit de transcrição reversa (SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), Kit de extração de RNA (PureLink® RNA Mini Kit, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), ácido cítrico, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), proteinase K, Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 (DMEM-F12), papaína, colagenase I, agarose, β-glicerolfosfato, dexametasona e ácido ascórbico (Sigma Aldrich, Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), dispase (MP Biomedicals, Califórnia, EUA), marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder) e corante não mutagênico safer (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil).

Os equipamentos utilizados: Centrífuga (5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), agitador magnético (IKA HS 7, Biovera, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), centrífuga (mini spin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), capela de fluxo (Class II BSC, Esco, Cingapura), banho-maria (FANEM, São Paulo, Brasil), Espectrometro Raman Bruker RFS 100 (Bruker, EUA), Microscópio invertido (Nikon TS100F, Melville, EUA), Microscópio de varredura (DSM 950, Zeiss, Alemanha),

espectrômetro (RFS 100, Bruker, EUA), Incubadora (Forma Series 3 Water Jacketed, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), Espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), termociclador Eppendorf® Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), fonte eletroforese (EPS 300-IIV, CBS scientific, Cambridge, Reino Unido), transiluminador (Gel DOC-IT, UVP, Upland, CA, EUA), photoshop CC 2018 (Adobe Systems, San José, Califórnia, EUA), GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

As células-tronco utilizadas se encontram armazenadas no Biobanco Genética Humana e Terapia Celular (GENETEC – CONEP 22/2015) do Laboratório de Genética, Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.3.3 PRODUÇÃO DE HIDROGEL DE MATRIZ EXTRACELULAR ÓSSEA BOVINA

Inicialmente foram produzidos hidrogéis de ECM do osso trabecular e cortical e ambos foram comparados quanto à quantidade de DNA e conteúdo de PG e GAGs. No entanto, devido a maior facilidade de manipulação do osso trabecular, o mesmo foi escolhido como fonte de ECM para a produção de hidrogel.

Fêmures bovinos foram obtidos de um açougue da cidade de Juiz de Fora. A idade e sexo dos animais abatidos não foram informados. Os ossos foram transportados à temperatura ambiente, em seguida, a região trabecular foi separada e a região cortical, cortada em discos finos com auxílio de serra. Ambos os materiais foram armazenados a -20°C *overnight* até a chegada ao laboratório de Genética Humana e Terapia celular (GENETEC), onde foram armazenados a -80°C até seu uso.

A fim de estabelecer um protocolo eficiente no GENETEC, a desmineralização foi feita com ácido cítrico de acordo com Ruggeri et al. (2007), com modificações e com ácido clorídrico (HCl) de acordo com Sawkins et al. (2013).

Hidrogel de ECM de Osso Cortical

Para retirada da gordura, osso cortical foi lavado por 1 hora, com uma solução de clorofórmio: metanol (1:1) com volume suficiente para cobrir o material, em seguida, foram feitas lavagens somente com metanol e então com água destilada a fim de retirar o solvente restante. O material foi então submetido ao tratamento com ácido cítrico (1M) até que o osso ficasse visivelmente transparente, indicando a retirada de cálcio.

Devido à dureza do material, a desmineralização não foi completa, mesmo após 30 dias de exposição ao ácido cítrico (1M) com trocas regulares de solução a cada quatro dias. Foram então retiradas lascas, com auxílio de bisturi, das regiões transparentes. Então as lascas foram descelularizadas com tripsina por 24 horas a 37°C. O material foi lavado com solução de antibiótico/antifúngico 1% (v/v) por 24 horas, liofilizado e armazenado a -80°C até o uso.

A produção do hidrogel foi feita de acordo com Sawkings et al. (2013). Lascas de osso desmineralizado com HCl (0,5 M) e descelularizado foram digeridos com pepsina 1 mg mL⁻¹ em HCl (0,01 M), formando a solução pré-gel 10 mg mL⁻¹, que foi armazenada a -20 °C até o uso. A gelificação foi feita adicionando-se 1/10 do volume de NaOH (0,1 M) e 1/9 do volume de PBS (10x), ambas a 4°C. A concentração final de ECM foi ajustada para 4 mg mL⁻¹ com PBS (1x) e colocada a 37°C por 1 hora para a gelificação.

Hidrogel de ECM de Osso trabecular

Inicialmente o osso trabecular foi desmineralizado tanto com ácido cítrico quanto com HCl. O osso trabecular em pedaços foi macerado com nitrogênio líquido até torna-se um pó fino.

A desmineralização com ácido cítrico (1M) foi feita de acordo Ruggeri et al. (2007), com modificações. O pó de ECM óssea permaneceu sob agitação até que o material ficasse visivelmente transparente (~4 dias). Em seguida o pó desmineralizado foi tratado com clorofórmio: metanol (1:1) para a retirada de lipídios. O osso desmineralizado foi então lavado com antibiótico 1% (v/v) por 24 horas. Então o material foi descelularizado com tripsina por 24 horas a 37°C. O material foi

lavado com solução de antibiótico 1% (v/v) por 24 horas, liofilizado e armazenado a -80°C até o uso.

A desmineralização com HCl (0,5 M) foi feita de acordo com Sawking et al., 2013. Após a retirada dos lipídeos com clorofórmio e metanol, a desmineralização foi feita com HCl (0,5 M) por 24 horas e a descelularização com tripsina por 24 horas a 37°C. O material foi então liofilizado e armazenado a -80°C até o uso.

A produção do hidrogel foi feita de acordo com Sawkings et al. (2013). Osso desmineralizado, com ácido cítrico e HCl, e descelularizado foram digeridos com pepsina 1 mg mL⁻¹ em HCl (0,01 M), formando a solução pré-gel 10 mg mL⁻¹, que foi armazenada a -20 °C até o uso. A gelificação foi feita adicionando-se 1/10 do volume de NaOH (0,1 M) e 1/9 do volume de PBS (10x), ambas a 4°C. A concentração final de ECM foi ajustada para 4 mg mL⁻¹ com PBS (1x) e colocada a 37°C por 1 hora para a gelificação.

A espectroscopia Raman, a caracterização reológica, MEV, avaliação da proliferação, morfologia e diferenciação celular foram feitos com hidrogel a 4 mg mL⁻¹, feito a partir de osso trabecular desmineralizados com HCl.

Para produção do nanobiocompósito, hidrogel de ECM com NP TB, as NP TB foram dispersadas no volume de PBS (1x) utilizado para diluir a ECM à concentração final desejada. A concentração final de NP TB foi de 0,1% (p/v).

4.3.4 AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE DESCELULARIZAÇÃO

4.3.4.1 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

A fim de avaliar a eficiência da descelularização foi feita a extração de DNA (SAMBROOK e RUSSEL, 2001, com pequenas modificações), sua quantificação e avaliação de integridade.

Foi feita extração de DNA de quatro amostras (*in natura*, desmineralizado, descelularizado e hidrogel) tanto do osso cortical quanto do osso trabecular, dos tratamentos com ácido cítrico (1M) e HCl (0,5M).

Aproximadamente 100 mg de cada amostra foram macerados em nitrogênio o tecido utilizando almofariz e pistilo. Imediatamente após a maceração, foram adicionados 500 µl de solução de lise (10 mM de Tris-HCl, 0,1M de EDTA e 0,5% de SDS, pH 8,0) e o material foi mantido durante 1 hora a 37° C.

Posteriormente, foi feita a digestão com proteinase K (10 mg mL⁻¹) a 55° C por 3 horas. Para a remoção das proteínas, foi adicionado um volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), centrifugou-se a 12.000 g por 5 minutos. Essa etapa foi repetida duas vezes.

Em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se a 12.000 g por 5 minutos. O DNA foi precipitado adicionando 0,2 volume de acetato de amônio (7,5 M) e 1 volume de isopropanol gelado. Incubou-se o material no freezer -80° C por 5 minutos, imediatamente depois as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. Em seguida, o DNA foi lavado com 700 µl de etanol 70% (v/v) gelado, centrifugado a 12.000 g por 5 minutos e depois lavado duas vezes com 700 µl de etanol 95% (v/v) e centrifugado a 12.000 g durante 5 minutos.

As amostras ficaram *overnight*, em temperatura ambiente, para secagem e em seguida, foram ressuspendidas em 50 µl de água ultrapura mantidos a 4° C por pelo menos 2 horas para ressuspensão completa do DNA. Por fim, o DNA foi armazenado em freezer -20° C. A qualidade e a quantidade do DNA também foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) utilizando o marcador de massa lambda. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 100 mA por aproximadamente 50 minutos.

4.3.4.2 COLOCAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

Foram feitas lâminas histológicas de três amostras (*in natura*, desmineralizado, descelularizado) tanto do osso cortical quanto do osso trabecular.

O preparo do material e análise foram feitos no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFJF.

O material foi fixado em formol 10% (v/v) por 24 horas, em seguida desidratado em seguidos banhos de álcool 70% (v/v), 90% (v/v) e absoluto. O material desidratado foi deixado *overnight* em banho de parafina histológica e em seguida emblocado.

Para retirada da parafina, as lâminas confeccionadas foram lavadas em xileno (3 vezes, 5 minutos cada) e álcoois (75%, 95% e 100% durante 2 minutos cada), em seguida, lavadas em água durante 2 minutos antes da imersão em hematoxilina durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água por 2 minutos e coradas com eosina durante 3 minutos. Em seguida, as lâminas passaram por uma série de álcoois (75%: 30 segundos, de 95%: 1 minuto, 100%: 2 minutos) e em seguida em xileno (duas vezes, cada uma durante 2 minutos). O agente de montagem resinoso Bálsamo do Canadá foi aplicado em cima dos cortes nas lâminas para colocar as lamínulas e, então, as lâminas ficaram em temperatura ambiente por 24 horas até secar. Os cortes histológicos foram visualizados em microscopia de luz.

4.3.5 EXTRAÇÃO DE PROTEOGLICANOS E GLICOSAMINOGLICANOS

A fim de avaliar se após o processo de produção do hidrogel de ECM óssea, os proteoglicanos e glicosaminoglicanos ficaram retidos no hidrogel. Todo processo de extração e análise foi realizado no Laboratório de Análise Glicoconjugados da UFJF. Os ossos do tipo cortical e trabecular frescos foram usados como controle. Comparou-se o conteúdo de PG e GAG nos tratamentos de desmineralização com ácido cítrico e HCl.

A extração de proteoglicanos foi feita com 10 volumes de guanidina (4M) por 24 horas sob agitação, ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto a fim de precipitar os proteoglicanos e o material foi centrifugado a 1.125 g por 15 minutos. O *pellet* resultante foi seco em vácuo. Amostras de cada tratamento foram ressuspensas em água e em solução aquosa de DMSO a 1% (v/v). A

concentração final das amostras foi 10 mg mL^{-1} . Alíquotas de $5 \mu\text{l}$ foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% (p/v), tampão 1,3-diaminopropano (PDA) (0,05 M), pH 9,0 (DIETRICH e DIETRICH, 1976).

Para extração de glicosaminoglicanos as amostras foram pesadas e submetidos à proteólise com papaína (1 mg mL^{-1}) em tampão fosfato-cisteína 0,05 M, pH 6,5) por 18 horas a 60°C . Em seguida, os produtos da digestão foram centrifugados a 1.125 g por 15 minutos, ao sobrenadante foram adicionados à concentração final de 10% de TCA e de NaCl 1M. As amostras foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos em centrifugadas novamente. Ao sobrenadante adicionou-se, lentamente e sob agitação, 2,5 volumes de etanol PA para precipitação de GAG. Para a precipitação, as amostras foram colocadas *overnight* a -20°C e centrifugadas (VAN WIJK et al. , 2012). O *pellet* resultante foi seco à vácuo. Amostras de cada tratamento foram ressuspensas em água. A concentração final das amostras foi 10 mg mL^{-1} . Alíquotas de $5 \mu\text{l}$ foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,5% (p/v), tampão 1,3-diaminopropano (PDA) (0,05 M), pH 9,0 (DIETRICH e DIETRICH, 1976).

4.3.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medições de Raman foram realizadas com um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd + 3 / YAG a 1.064 nm , equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido. Os espectros foram adquiridos a uma resolução de 4 cm^{-1} . Uma média de 1024 scans foi coletada com uma potência de laser de 110 mW . As medições foram feitas no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular da UFJF.

4.3.7 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

Os hidrogéis foram mantidos a 4°C durante o transporte e armazenamento. Para a caracterização reológica, e aproximadamente 2 mL de amostra foram posicionadas sobre a placa do reômetro HAAKE-VT550. A placa foi mantida a 37°C durante todo o ensaio. Foram capturados os dados de tensão de cisalhamento a cada 30 segundos durante 3.600 segundos. A taxa de cisalhamento (escorregamento) da placa foi mantida constante em 57 /s.

4.3.8 MISCROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Amostras da ECM óssea e de ECM óssea com NP TB foram desidratadas por liofilização. Em seguida, o material seco foi colocado em stub de alumínio utilizando uma fita de carbono adesiva (77816, EMS-EUA). A metalização foi feita em atmosfera de argônio com ouro em um metalizador, utilizando corrente de 30 mA por 60 segundos e espessura aproximada de 200 Å. A visualização do material foi realizada em microscópio eletrônico de varredura operado a 20 kV com filamento de tungstênio. As análises foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES.

4.3.9. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As MSCs foram cultivadas em meio de crescimento DMEM-F12 suplementado com SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). As células foram incubadas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 ° C. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Para a subcultura de rotina, as células foram desprendidas por tripsinização quando cerca de 80% de confluência foi atingida.

Células-tronco mesenquimais humanas (1x10³) foram plaqueadas em placas de 96 poços. As MSCs foram plaqueadas diretamente em 100 µL de hidrogel.

Após 1 e 7 dias de cultura nos hidrogéis, foi feita a avaliação da proliferação celular de MSCs humanas foi realizada utilizando o ensaio de MTT. Resumidamente, adicionou-se 20 µL de solução MTT (5 mg mL⁻¹) a 180 µL de DMEM-F12, então adicionou-se 200 µL a cada poço contendo os hidrogéis com as células e incubou-se durante 4 horas a 37 ° C, 5% CO₂. Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 200 µL de álcool isopropílico ácido e a placa foi incubada durante 1 hora a 37 °C para dissolver os cristais de formazan. Em seguida, a absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em oitoplicata e repetidos duas vezes.

4.3.10 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

A fim de avaliar a morfologia celular foi, 3 x 10⁴ MSCs foram plaqueadas em placa de 24 poços diretamente em 1 mL de cada hidrogel e como controle foram plaqueadas na placa de cultura de plástico (TCP). As células foram cultivadas com meio basal: DMEM-LG, SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). A avaliação da morfologia celular foi feita após 7, 14 e 21 dias de cultura.

4.3.11 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA

A fim de avaliar a diferenciação óssea em hidrogéis de ECM e hidrogéis de ECM com NP TB, as células MSC foram cultivadas por 21 dias. Inicialmente MSCs (3 x 10⁴) foram plaqueadas em placa de 24 poços diretamente em 1 mL de cada hidrogel e como controle foram plaqueadas na TCP. As células foram cultivadas com meio basal: DMEM-LG, SFB 10% (v/v) e antibiótico 1% (v/v). A avaliação da expressão de genes marcadores de diferenciação óssea foi feita por transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando os *primers* ALP, BMP-2, BMP-4 e GAPDH, descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Sequências dos primers usadas para a análise da expressão gênica relativa por RT-PCR.

Gene	Sequência dos primers (5'-3')	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Fragmento
ALP	F: CCAAAGGCTTCTTCTTGCTG R: CCACCAAATGTGAAGACGTG	60°C	189
BMP-2	F: TCAAGCCAAACACAAACAGC R: TGATCAGCCAGAGGAAAAGG	60°C	162
BMP-4	F: TGATACCTGAGACGGGGAAG R: CCAGACTGAAGCCGGTAAAG	60°C	199
GAPDH	F: AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT R: AACGTGTCAGTGGTGGACCTG	60°C	160

4.3.12 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração de RNA foi realizada após 21 dias de cultivo das MSC nos os hidrogéis. Para extração do RNA a ECM e a ECM com NP TB foram digeridas por 2 horas a 37°C com 500 µl de colagenase (3 mg mL⁻¹) e dispase (4 mg mL⁻¹) em PBS (1x) para liberação das MSCs. Após a digestão as células e ECM digerida foram centrifugadas a 2000 g por 2 minutos e 30 segundos. O *pellet* foi lavado com PBS (1x) e as células foram rompidas por choque térmico em nitrogênio líquido.

A extração de RNA foi feita utilizando o PureLink® RNA Mini Kit, acordo com manual de instruções. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas utilizando Nanodrop 2000.

4.3.13 RT-PCR

Para avaliar a expressão gênica semi-quantitativa foi feita a transcrição reversa do RNA utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix, de acordo com as instruções do Fabricante. Os níveis de mRNA para a BMP-2, BMP-4, ALP foram avaliados por RT-PCR. GAPDH foi utilizado como normalizador. Para cada reação foram utilizados 128 ng de cDNA, tampão (1x), 0,25 µM de cada *primer* (F e R), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de dNTP e 1 U de *taq* polimerase, em um volume

final de 25 μ L. Para a avaliação semi-quantitativa foram feitos 25, 30, 32 e 35 ciclos da PCR. As condições da reação de RT-PCR para todos os primers foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos e ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento dos primers a 60 °C por 30 segundo e extensão a 72°C por 1 minuto. Os produtos da RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) a 100 mV com marcador de peso 100 pb. A quantificação dos produtos da PCR foi feita no *software* Photoshop CC 2018 medindo-se os *pixels* das bandas das imagens capturadas.

4.3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram utilizando GraphPad Prism 7.0. Foi feita one-way ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 AVALIAÇÃO DA DESCELULARIZAÇÃO DA ECM

De maneira geral, os processos de desmineralização e descelularização tanto com HCl quanto com ácido cítrico do osso trabecular, seguiram os mesmos princípios e a aparência das amostras foi semelhante, como ilustrado na Figura 17.

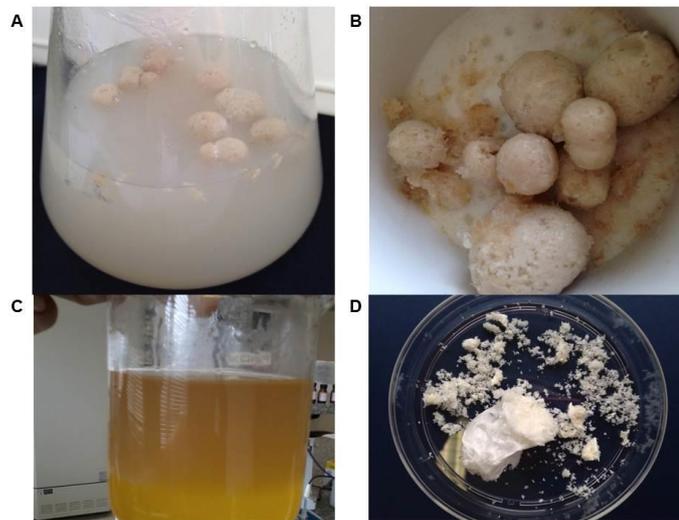


Figura 17: Processo desmineralização osso trabecular. A- Desmineralização com ácido; B- Matriz osso trabecular desmineralizada; C- Retirada de lipídeos; D- Matriz desmineralizada e liofilizada.

A desmineralização do osso cortical foi feita somente com ácido cítrico, pois observou-se que o uso de HCl não foi capaz de desmineralizar as amostras. A Figura 18 ilustra a desmineralização do osso cortical.

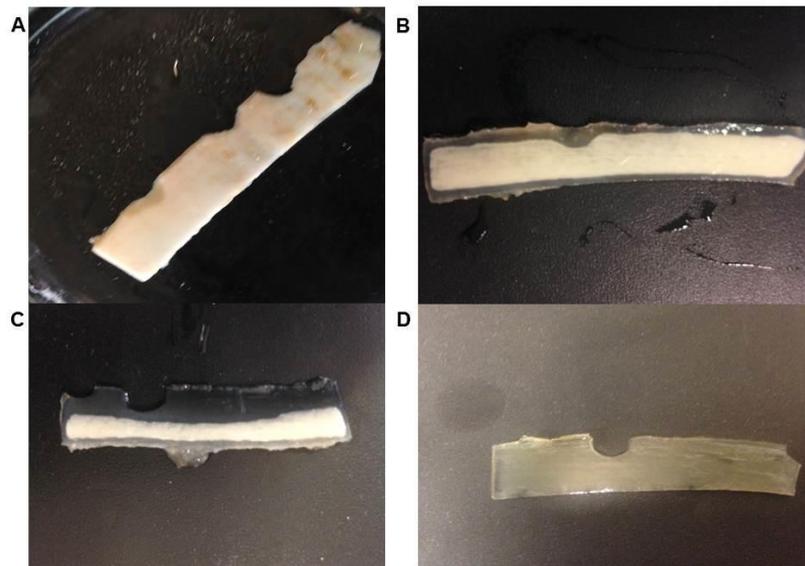


Figura 18: Processo de desmineralização de lascas de osso cortical bovino com ácido cítrico (1M). A- Dia 1; B- Dia 4; C- Dia 18; D- Dia 28. Em branco nota-se o osso ainda mineralizado e, já transparente, a matriz desmineralizada.

A coloração de HE feita nas amostras de osso trabecular desmineralizadas com ácido clorídrico e descclularizadas com tripsina mostrou a efetiva desmineralização e descclularização (Figura 19). A desmineralização do osso cortical com ácido cítrico também foi eficiente (Figura 20).

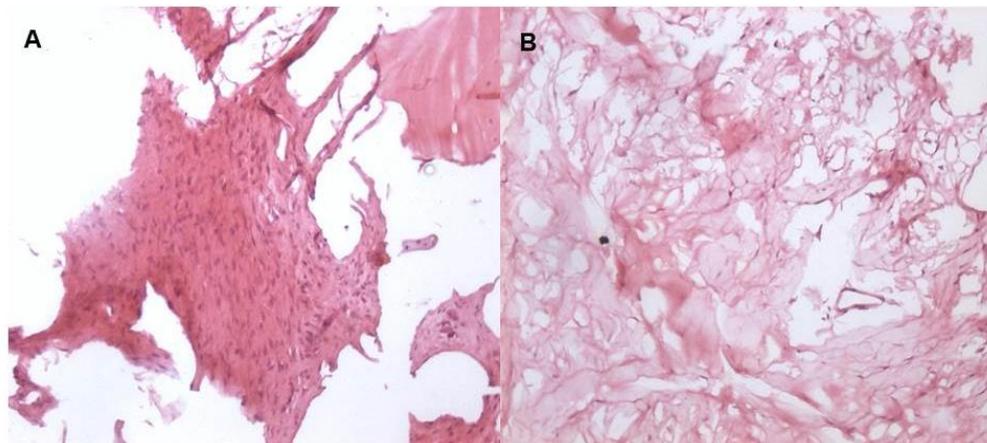


Figura 19: Coloração por HE. A- Osso trabecular bovino não tratado. B- Osso trabecular bovino desmineralizado com ácido clorídrico (0,5 M) e descclularizado com tripsina (0,25%).

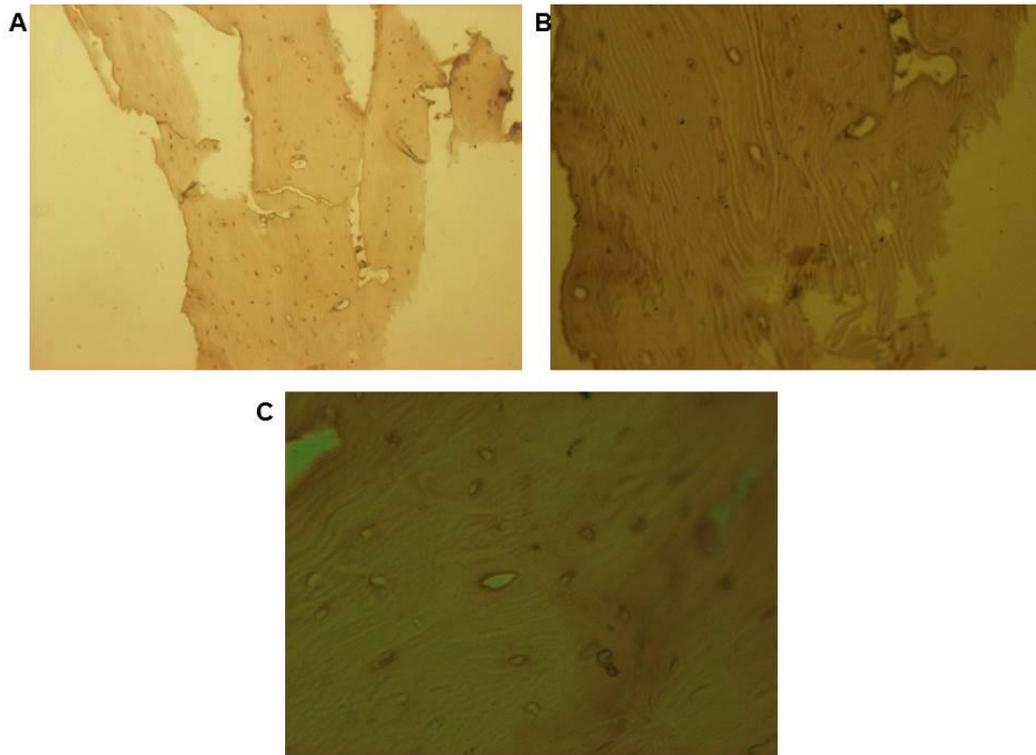


Figura 20: Coloração com HE. Osso cortical bovino desmineralizado com ácido cítrico. A- Corte transversal, 100X; B- Corte transversal, 200X; C- Corte transversal, 400X. Observa-se lacunas deixadas pela retirada das células.

Para confirmar a descélularização, a extração de DNA também foi feita assim como a avaliação de sua integridade. Foi avaliado o conteúdo de DNA dos hidrogéis feitos a partir de osso trabecular e cortical desmineralizados com ácido cítrico e de osso trabecular desmineralizado com ácido clorídrico.

Na avaliação do conteúdo de DNA foi possível confirmar a descélularização. Nos dois tipos de osso e nos tratamentos com ambos os ácidos, no gel de agarose não foi detectado DNA ou o mesmo estava degradado (Figuras 21 e 22).

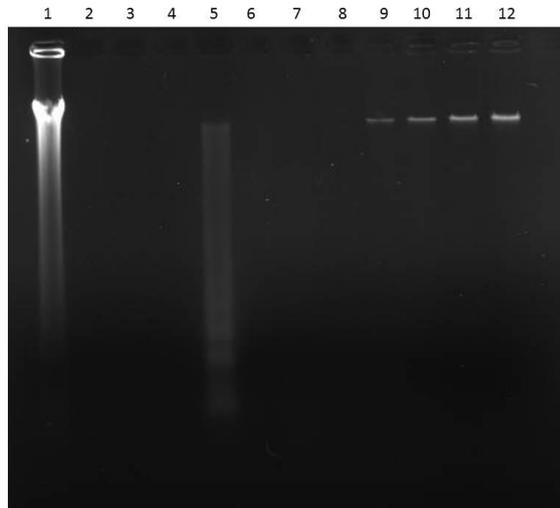


Figura 21: Avaliação da quantidade e qualidade de DNA após tratamento com ácido cítrico. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular desmineralizado; 3: osso trabecular desmineralizado e descelularizado; 4: osso trabecular digerido com pepsina; 5: osso cortical não tratado; 6: osso cortical desmineralizado; 7: osso cortical desmineralizado e descelularizado; 8: osso cortical digerido; 9, 10, 11 e 12: marcadores de massa: 25ng, 50ng, 100 ng, 200 ng.

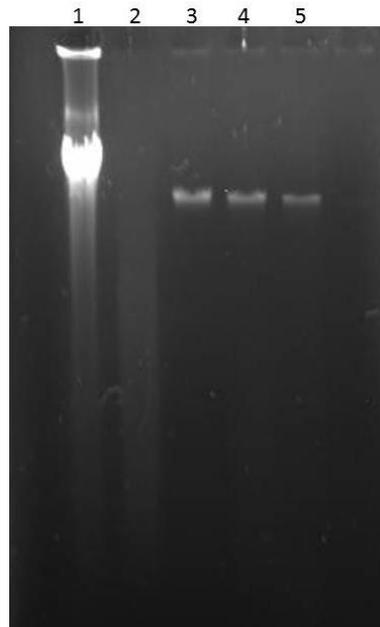


Figura 22: Avaliação da quantidade e qualidade de DNA após tratamento com ácido clorídrico. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular digerido com pepsina; 3, 4 e 5: marcadores de massa: 25ng, 50ng, 100 ng.

4.4.2 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DA ECM ÓSSEA

Foi observado que após todos os tratamentos, nos hidrogéis permaneciam glicosaminoglicanos, porém não se conseguiu extrair proteoglicanos (Figura 23). Nos hidrogéis feitos a partir do osso desmineralizado com ácido cítrico obteve-se maior quantidade de glicosaminoglicanos do que naqueles nos quais foi utilizado ácido clorídrico para a desmineralização (Figura 23).

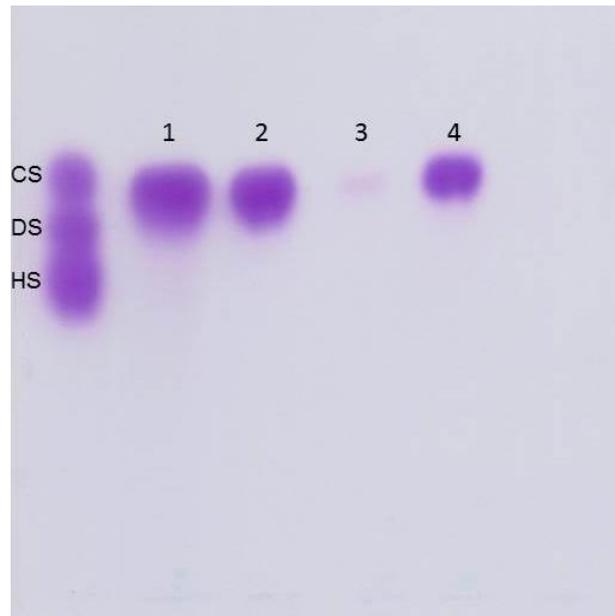


Figura 23: Eletroforese em gel de agarose do produto da proteólise de hidrogéis de ECM óssea, glicosaminoglicanos. CS: condroitin sulfato; DS: dermatan sulfato; HS: heparan sulfato. 1: osso trabecular não tratado; 2: osso trabecular desmineralizado com ácido cítrico; 3: osso trabecular desmineralizado com ácido clorídrico; 4: osso cortical desmineralizado com ácido cítrico.

4.4.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A caracterização de hidrogéis compostos por ECM e NP TB, mostrou bandas em 3230 e $2943/1465\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao alongamento / deformação O-H e C-H, respectivamente. Em 1422 cm^{-1} e 1163 cm^{-1} , podem ser observadas duas bandas correspondentes ao alongamento COO_2 e NH_3^+ . Vibração de estiramento de C = O em 1651 cm^{-1} e vibrações de dobra de N-H do grupo peptídico, em 1243 cm^{-1} . Os dois modos com frequências próximas a 714 e 307 cm^{-1} podem ser associados ao TB (Figura 24).

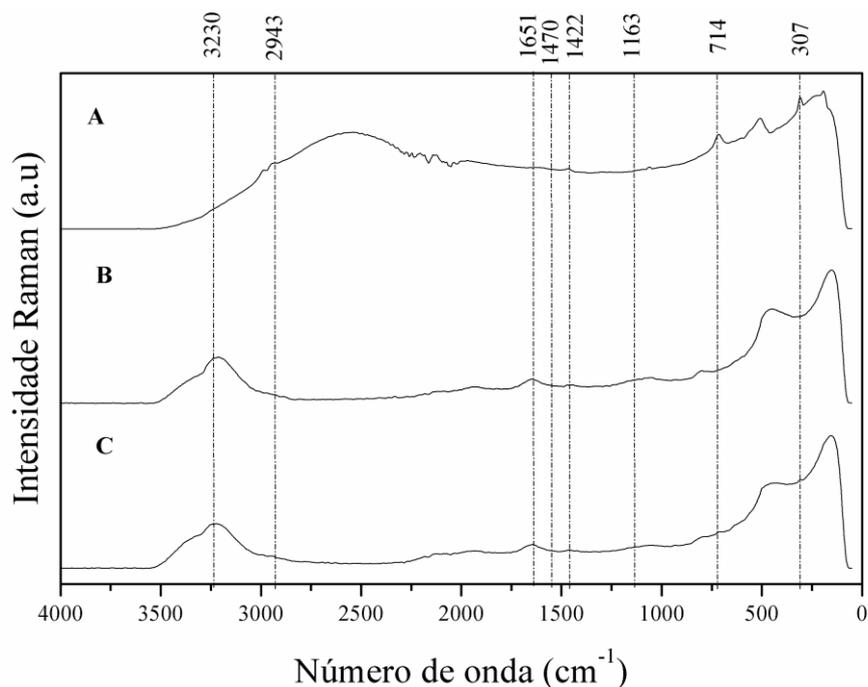


Figura 24: Espectro Raman de (a) NP TB, (b) Hidrogel ECM, (c) Hidrogel ECM com NP TB.

4.4.4 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

A medição da viscosidade foi feita durante 1 hora. Os hidrogéis foram armazenados a 4°C. Ao serem transferidos para o reômetro, a 37°C, simulando a temperatura fisiológica, a viscosidade inicial foi de 336 mPa·s para o hidrogel de ECM óssea e 188 mPa·s para o hidrogel de ECM com NP TB. A partir da segunda medição, aos 30 segundos, houve uma inversão e a viscosidade do hidrogel de ECM com NP TB permaneceu maior que a do da ECM pura (Figura 25).

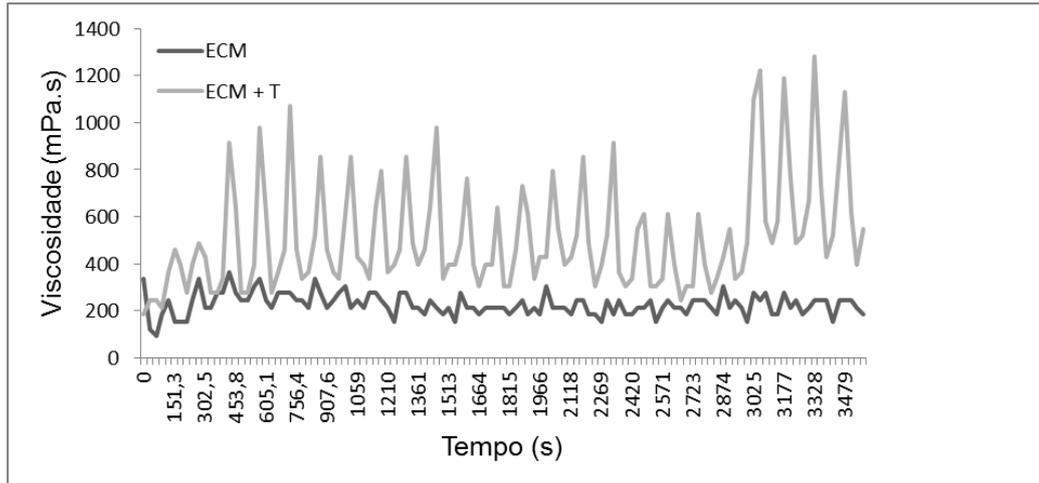


Figura 25: Caracterização reológica. Viscosidade em função do tempo. Taxa de cisalhamento constante de 57/s.

4.4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 26 mostra a arquitetura dos hidrogéis produzidos. Nas Figuras 26A, 26B e 26C são mostradas imagens dos hidrogéis de ECM e nas imagens 26D, 26E e 26F dos hidrogéis de ECM com NP TB 0,1% (p/v). É possível observar que houve deposição das NP TB.

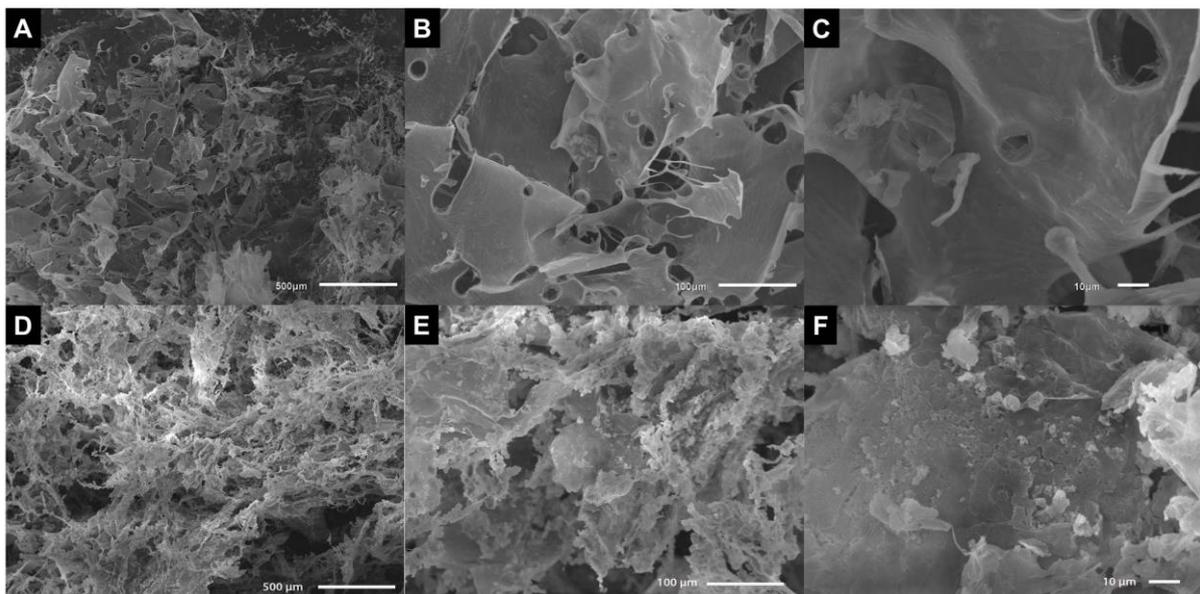


Figura 26: Arquitetura dos hidrogéis de ECM (A, B e C) e ECM com NP TB (D, E e F). Barra de escala: A e D: 500 μm , B e E: 100 μm e C e F: 10 μm . Com 250x, 500x, 1.000x de magnificação, respectivamente.

4.4.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A Figura 27, mostra os resultados do ensaio de MTT de MSCs cultivadas com os hidrogéis de ECM e ECM com NP TB em dois tempos, 1 e 7 dias. A absorbância é diretamente proporcional à proliferação celular. Em ambos os tempos de cultivo das MSCs não houve inibição significativa da proliferação celular quando as NP TB foram adicionadas ao hidrogel de alginato e durante os 7 dias de cultivo as células continuaram proliferando.

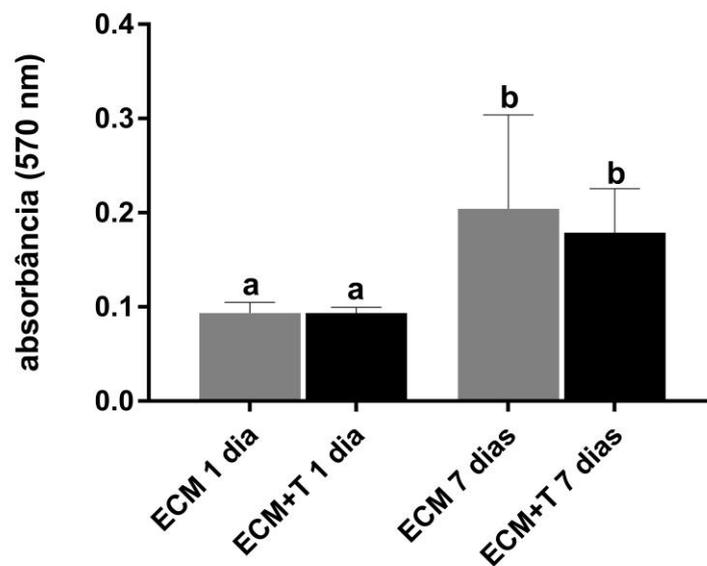


Figura 27: Avaliação da proliferação celular por MTT e após 1 e 7 dias de cultivo celular. Letras diferentes significam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). ECM: hidrogel de matriz extracelular óssea. ECM + T: hidrogel de matriz extracelular óssea com NP TB.

4.4.7 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR

As MSCs cultivadas com meio basal cresceram em aglomerados independentes, com distribuição similar no hidrogel de ECM e de ECM com NP TB, diferentemente daquelas cultivadas na placa de cultura com meio basal, que mantiveram morfologia típica alongada de células-tronco (Figura 28).

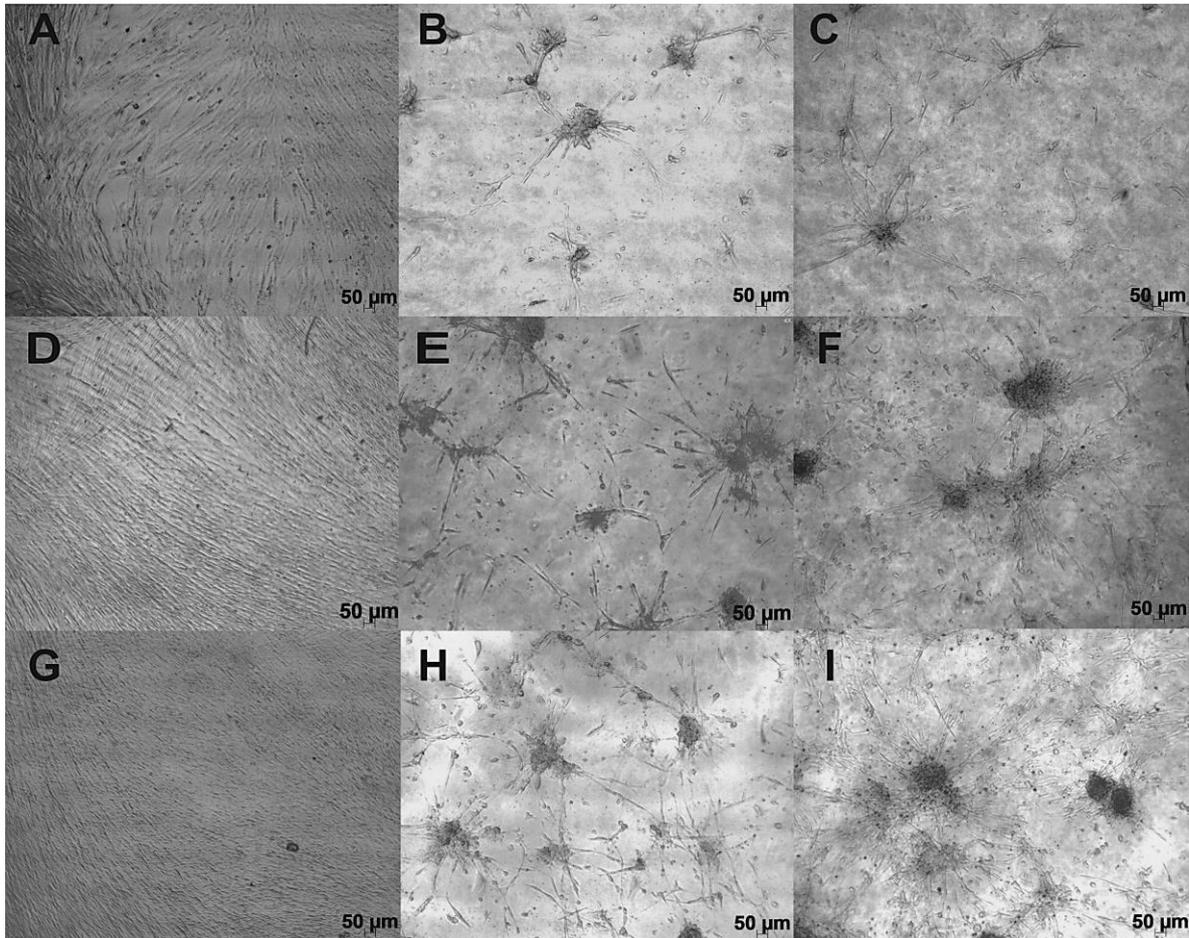


Figura 28: Morfologia das MSCs cultivadas em com meio basal por 7 (A, B e C), 14 (D, E e F) e 21 dias (G, H e I), em placa de cultura (A, D e G), hidrogel de ECM (B, E e H) e hidrogel de ECM com NP TB (C, F e I). Aumento 40x.

4.4.8 AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ÓSSEA NOS HIDROGÉIS

Para avaliar o potencial de indução de diferenciação osteogênica, foi analisada a expressão relativa de genes relacionados com este processo. O nível de expressão relativa de seus mRNAs foi avaliado de forma semi-quantitativa por RT-PCR. Foi comparado o nível de expressão das MSCs cultivadas nos hidrogéis de

ECM e ECM com NP TB com aquelas cultivadas em TCP e entre as cultivadas nos hidrogéis (Figura 29).

Ao comparar-se a expressão das MSCs cultivadas em ambos os hidrogéis com a daquelas cultivadas na TCP, houve aumento da expressão de *ALP* ($p < 0,0001$) e diminuição da expressão da *BMP-4* ($p < 0,0001$). Em relação à expressão de *BMP-2*, houve aumento da expressão ($p < 0,0001$) em relação à TCP quando as células foram cultivadas em hidrogel de ECM, mas não houve diferença quando cultivadas em hidrogel de ECM com NPTBs.

Comparando-se a expressão de *ALP* entre os hidrogéis, houve um aumento significativo quando foram adicionadas NP TB ao hidrogel de ECM ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa na expressão de *GAPDH* entre nenhum dos grupos avaliados.

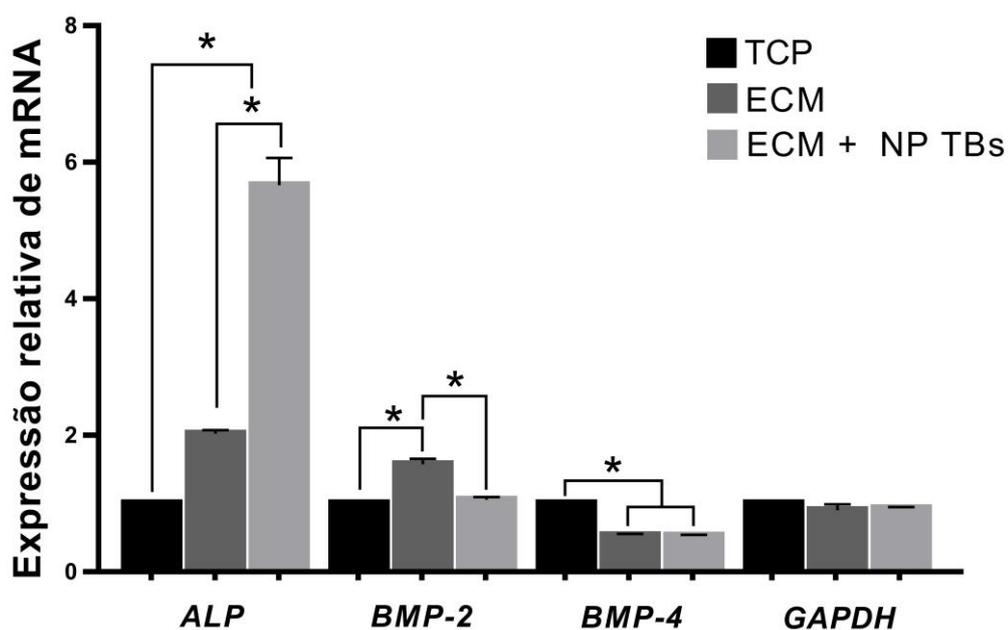


Figura 29: Nível de expressão gênica relativa de genes marcadores de diferenciação osteogênica. * significa que houve diferença estatística ($p < 0,001$) pelo teste de Tukey.

4.5 DISCUSSÃO

Na bioengenharia de tecidos o uso de hidrogéis como biomateriais 3D para suporte do crescimento celular, assim como para o estímulo da diferenciação de células-tronco em células ósseas é promissor e já se demonstrou que há um aumento na osteogênese quando há o uso desses biomateriais de diferentes composições (PADUANO et al., 2016). Já foi demonstrado que as células apresentam comportamento atípico quando retiradas de seu ambiente tridimensional. A utilização de hidrogéis mimetiza o ambiente natural das células, permitindo melhor avaliação e entendimento do seu comportamento (TIBBITT e ANSETH, 2009, ROMANO et al., 2011).

A AR é uma doença que atinge as articulações e a perda óssea ocorre já nos estágios iniciais da doença. Tanto osso cortical como trabecular são afetados (MCINNES e SCHETT, 2017). O tratamento hoje disponível inclui medicamentos que amenizam as dores e impedem o avanço da doença, mas não há um tratamento efetivo para a recuperação da matriz óssea já perdida.

O uso de biomateriais provenientes do mesmo tipo de tecido que se pretende regenerar tem como vantagem a composição semelhante: proteínas, fatores de crescimento e citocinas (MARCUS et al., 2009; AMINI et al., 2012). Tais componentes orgânicos, participam da modulação da resposta celular ao ambiente no qual se encontram (TAN et al., 2014).

O processo de produção de hidrogéis de matriz óssea é complexo, pois a qualidade de matriz varia com a idade, estado nutricional, sexo e histórico de doenças (SROGA et al., 2011). Até mesmo dentro do tecido pode haver variação. Segundo Watt e Huck (2013), a composição dos proteoglicanos da matriz pode variar dependendo da distância da superfície.

A descelularização é importante na produção de biomateriais, pois aqueles que possuem células intactas mostraram-se mais pró-inflamatórios do que os descelularizados. Além disso, a presença de células intactas pode levar a um remodelamento inadequado do novo tecido/órgão (BROWN et al., 2009).

O DNA e o epítipo Gal, não encontrado em humanos, são os biomateriais. Os seres humanos, por não terem Gal, produzem anti-Gal devido ao

contato com bactérias no intestino que tem Gal. Esse fato faz com a descelularização de tecidos xenólogos seja de extrema importância para evitar resposta inflamatória contra o enxerto (CHENG et al., 2014). A descelularização dos hidrogéis de ECM produzidos neste trabalho foi demonstrada pela extração de DNA e cortes histológicos (Figuras 19 a 22). Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, que preconiza a ausência de núcleo na coloração de HE, menos de 50 ng mg^{-1} de tecido e fragmentos com menos de 200 pb (CRAPO et al., 2011).

Após os procedimentos de desmineralização e descelularização houve a preservação de glicosaminoglicanos (GAGs) nos hidrogéis, não sendo possível observar PGs (Figura 23). Possivelmente a descelularização com tripsina e a digestão com pepsina digeriu a parte proteica dos PGs. Os GAGs são polissacarídeos ligados ao um centro proteico de um PG. Os PGs e seus GAGs ligam-se à hidroxiapatita, componente da parte inorgânica da matriz óssea. Tem papel na organização da matriz extracelular, fibrilogenese e deposição de minerais (FERREIRA et al., 2012; COULSON-THOMAS et al., 2015). Os GAGs são polisacarídeos lineares compostos de unidades repetidas de dissacarídeos que consistem em unidades de hexosamina e unidades ácido hexurônico e galactose, que podem ser sulfatados em diferentes posições. A sulfatação em diferentes posições faz com que haja grande variabilidade nas cadeias de GAGs, importante na interação célula-célula e célula-matriz. Glicosaminoglicanos podem ser classificados em cinco grupos: condroitin 4- e 6-sulfato (C4S, C6S), queratano sulfato (KS), ácido hialurônico (HA), dermatano sulfato (DS), hapain e heparano sulfato (HS) (COULSON-THOMAS, 2015). Tanto no material desmineralizado com ácido cítrico como no desmineralizado com HCl foi encontrado CS, um GAG comum às ECMs ósseas bovina (FRANZEN e HEINEGARD, 1984) e humanas (COULSON-THOMAS et al., 2015).

Além dos componentes orgânicos da ECM, as células também respondem a estímulos mecânicos como, por exemplo, rigidez, porosidade, tamanho de poros, pontos de adesão (TAN et al., 2014) e organização da superfície em que se encontram (DALBY et al., 2014). Por isso, a caracterização físico-química de biomateriais é de extrema importância antes de seu uso tanto para testes iniciais *in vitro*, como para aplicação *in vivo* (TAN et al., 2014).

A caracterização por espectroscopia Raman mostrou bandas em 3230 e 2943/1465 cm^{-1} atribuídas ao alongamento/deformação O-H e C-H, respectivamente. Em 1422 cm^{-1} e 1163 cm^{-1} , podem ser observadas duas bandas correspondentes ao alongamento COO_2 e NH_3^+ , respectivamente (HWANG e LYUBOVITSKY, 2013). A vibração de estiramento de C = O em 1651 cm^{-1} e vibrações de dobra de N-H do grupo peptídico em 1243 cm^{-1} são sinais de identificação do *backbone* proteico (RYGULA et al., 2013) (Figura 24). Os dois modos com frequências próximas a 714 e 307 cm^{-1} podem ser associados ao TB, confirmando sua presença no hidrogel (LARA et al., 2017).

As características mecânicas do biomaterial influenciam o comportamento celular. A célula responde de forma diferente à variação na rigidez da matriz, que afeta a proliferação, viabilidade e diferenciação celular (TAN et al., 2014). A análise reológica foi feita com os hidrogéis já gelificados com taxa de cisalhamento e temperatura constantes. Foram obtidos dados de viscosidade dos hidrogéis. Na reologia, viscoelasticidade é um termo aplicado a materiais que tem comportamento intermediário entre líquido e sólido (BRANDL et al., 2007). A viscosidade inicial da ECM, 336 mPa.s, foi maior do que a viscosidade da ECM com NP TB, 188 mPa.s, porém com o passar do tempo de medição a ECM com NP TB apresentou maior viscosidade (Figura 25). A ECM com NP TB apresentou viscosidade e variação desta maior durante os 60 minutos de avaliação. A adição de hidroxiapatita a hidrogel já demonstrou aumentar a viscosidade desse material (DEMIRTAŞ et al., 2017).

Pode-se observar nas imagens de MEV mostraram as NP TB depositadas por todo hidrogel cobrindo os poros (Figura 26). Utilizando NPs de hidroxiapatita, Bahera et al. (2017) produziram um hidrogel com morfologia semelhante, que promoveu de forma eficiente a proliferação de células humanas. A deposição das NP TB altera a nanotopografia do biomaterial, o que pode favorecer a adesão celular (BAHERA et al., 2017; ALOM et al., 2017).

Hidrogéis de ECM já demonstraram boa biocompatibilidade com células humanas. Sawkings et al. (2013) demonstraram que hidrogel de ECM óssea promoveu a proliferação de células da calvária de camundongos quando comparados a hidrogel de colágeno do tipo I. Além disso, NP TB também já foram avaliadas quanto à sua biocompatibilidade com diferentes tipos celulares:

neuroblastoma (CIOFANI et al., 2010a), células H9C2 (CIOFANI et al., 2010b), células-tronco mesenquimais de ratos (CIOFANI et al., 2013), fibroblastos murinos (células L929) (ZHANG et al., 2014) e fibroblasto NIH3T3 (SERRA-GÓMEZ et al., 2016). Também foi avaliado pelo nosso grupo a biocompatibilidade com MSCs e foi demonstrado que as NP TB não causaram inibição da proliferação, aumento do estresse oxidativo e modificação da morfologia das MSCs. Neste trabalho a combinação de NP TB com hidrogel de ECM não alterou a proliferação das MSCs (Figura 34). A combinação de NP TB com outros hidrogéis levou a aumento da viabilidade celular (SERRA-GOMEZ et al., 2016).

Além disso, o uso de outras NP com propriedades semelhantes à parte mineral EMC óssea vem demonstrando ser uma forma para reforçar os biomateriais (DA SILVA e DREISS, 2016) e aumentar a capacidade de indução de diferenciação osteogênica. Já foram utilizadas NP de titanato de cálcio, titanato de estrôncio (BAGCHI et al., 2014) e hidroxiapatita (BEHERA et al., 2017).

As MSCs plaqueadas nos hidrogéis cresceram em aglomerados ou nódulos independentes com células proliferando a partir destes aglomerados (Figura 28). Paduano et al. (2016) observaram padrão de crescimento semelhante também cultivando MSCs da polpa dentária em hidrogéis de ECM óssea e também Blair et al. (2017) cultivando células da calvária de camundongos. Nos hidrogéis de ECM com NP TB é possível perceber mais células ao redor dos nódulos. A diferenciação óssea em TCP ocorre onde há um agregado de células, em forma de nódulos, onde ocorre a secreção da ECM (BLAIR et al., 2017). Apesar de não ter sido avaliada a mineralização dos nódulos observados nos hidrogéis de ECM e ECM com NP TB, em conjunto com os dados da RT-PCR, sugere-se que sejam nódulos ósseos, que indicam o início de mineralização.

A ALP é um componente chave das vesículas secretadas pelos osteoblastos e um dos melhores marcadores de diferenciação e mineralização (BAO et al., 2016). Ela é uma enzima ligada à membrana envolvida na preparação da matriz extracelular óssea para deposição mineral (BAGCHI et al., 2014). Sua atividade é largamente utilizada para confirmação da diferenciação óssea (BELOTI et al., 2006, Li et al., 2017). A expressão de ALP pelas células cultivadas em ambos os hidrogéis de ECM foi maior ($p < 0,0001$) do que expressão daquelas cultivadas na TCP. Além disso, a adição de NP TB ao hidrogel aumentou a expressão ($p < 0,0001$)

em relação ao hidrogel puro após 21 dias de cultivo (Figura 29). A expressão de *ALP* está relacionada com processo de desenvolvimento e maturação da matriz extracelular em cultura (STEIN et al., 1993). Choi et al. (2011) demonstraram que MSCs cultivadas em TCP com meio indutor são capazes de iniciar diferenciação osteogênica, com início da expressão de *ALP* aos 11 dias de cultivo, aumentando até o dia 21. Utilizando um biomaterial funcionalizado com NP TB, Li et al. (2017) observaram a atividade da *ALP* aumentada em relação ao biomaterial não funcionalizado após 21 dias de cultivo celular. Alom et al. (2017) utilizaram hidrogel de ECM óssea bovina, produzida utilizando o mesmo protocolo deste trabalho (SAWKINGS et al., 2013) e o hidrogel somente, sem necessidade do uso de meio indutor de diferenciação, estimulou a expressão de *ALP* por células da calvária de camundongos.

A expressão de *BMP-4* não foi alterada pela adição das NP TB ao hidrogel, porém sua expressão foi menor ($p < 0,0001$) em relação à das células cultivadas na TCP. Já *BMP-2* teve sua expressão aumentada ($p < 0,0001$) somente no hidrogel de ECM pura (Figura 29). O papel de citocinas como as BMPs na diferenciação osteogênica já é questionado atualmente. Elas têm papel na osteogênese, mas por si só podem não ser capazes de influenciar a osteogênese (BLAIR et al., 2017). O processo de osteogênese é um processo biológico complexo que envolve a regulação da expressão de genes marcadores de osteoblastos e é um processo regulado de forma dependente do tempo (STEIN et al., 1993, CHOI et al., 2011). Cheng et al. (2003) avaliaram o papel de 14 BMPs na osteogênese em diferentes linhagens celulares, concluindo que a resposta a estas citocinas varia de acordo com o tipo celular.

Em conjunto, o aumento da expressão de *ALP* e a formação dos nódulos ósseos, sugerem que a adição de NP TB ao hidrogel de ECM, promoveu a diferenciação osteogênica de MSCs. É importante ressaltar que somente a ECM foi capaz de aumentar a expressão de *ALP*, mesmo na ausência de meio indutor. As NP TB potencializaram essa capacidade intrínseca de induzir a diferenciação óssea. Já foi demonstrado que as NP TB são capazes de induzir e/ou aumentar a diferenciação osteogênica (GENCHI et al., 2016). Diversos trabalhos relataram o uso de TB com objetivo de induzir a diferenciação osteogênica (CIOFANI et al., 2013; ZHANG et al., 2014; LI et al., 2017).

O TB é muito utilizado na bioengenharia de tecido ósseo, devido a sua piezoelectricidade, que tem potencial para ser usada como uma fonte de carga, mimetizando o estresse gerado naturalmente pelo deslizamento das fibras de colágeno (ZHANG et al., 2014) e potencialmente tem a capacidade de formar dipolo elétrico e atrair íons de cálcio e fosfato, ajudando na formação óssea.

Do ponto de vista da aplicação do biomaterial, é interessante que o mesmo seja capaz de induzir a diferenciação sem a necessidade do uso de indutores químicos. O hidrogel de ECM óssea já demonstrou *in vivo* aumentar a porcentagem do volume ósseo, mineralização quando comparado a um hidrogel de ECM irradiado com UV. A irradiação foi feita com objetivo de inativar componente endógenos da ECM (GOTHARD et al., 2015). Tais dados mostram que a ECM pode preservar em sua composição fatores que estimulam a diferenciação osteogênica, tanto *in vitro* (PADUANO et al., 2016, ALOM et al., 2017) como *in vivo* (GOTHARD et al., 2015).

Neste trabalho foi produzido com sucesso um hidrogel de ECM óssea bovina. A adição de NP TB aumentou a viscosidade e, possivelmente, proporcionou mais pontos de adesão para as MSCs. Além disso, o biomaterial produzido apresentou boa biocompatibilidade uma vez que a adição de NP TB não alterou a proliferação celular. De forma inédita, a nosso conhecimento, NP TB foram combinadas com hidrogel de ECM óssea bovina e foi feita a avaliação da capacidade de indução de diferenciação osteogênica. O nanobiocompósito produzido aumentou a expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, mesmo na ausência de meio de cultura indutor de diferenciação.

4.6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi produzido com sucesso um hidrogel de ECM óssea e a ele adicionados NP TB. O biomaterial produzido apresentou boa biocompatibilidade, e observamos que a adição de NP TB não alterou a proliferação celular e foi capaz de induzir ao aumento de expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, mesmo na ausência de indutores químicos de diferenciação. Neste contexto, os dados de expressão de marcadores de diferenciação osteogênica são corroborados com alterações morfológicas celulares.

4.7 PERSPECTIVAS

- Avaliar *in vitro* a taxa de liberação do anticorpo anti-IL-1 β -scFab pelo hidrogel de ECM e ECM com NP TB;
- Realizar ensaios pré-clínicos.

4.8 REFERÊNCIAS

ALOM, N.; PETO, H.; KIRKHAM, G. R.; SHAKESHEFF, K. M.; WHITE, L. J. Bone extracellular matrix hydrogel enhances osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts and mouse primary calvarial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 106, n. 2, p. 900-908, 2017

AMINI, A. R.; LAURENCIN, C. T.; NUKAVARAPU, S. P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, v. 40, n. 5, p. 363-408, 2012.

BAGCHI, A.; MEKA, S. R. K.; RAO, B. N.; CHATTERJEE, K. Perovskite ceramic nanoparticles in polymer composites for augmenting bone tissue regeneration. *Nanotechnology*, v. 25, n.48, 2014.

BAO, M.; WANG, X.; YUAN, H.; LOU, X.; ZHAO, Q.; ZHANG, Y. HAp incorporated ultrafine polymeric fibers with shape memory effect for potential use in bone screw hole healing. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, n. 31, p. 5308-5320, 2016.

BEHERA, S.; NASKAR, D.; SAPRU, S.; BHATTACHARJEE, P.; DEY, T.; GHOSH, A. K.; KUNDU, S. C. Hydroxyapatite reinforced inherent RGD containing silk fibroin composite scaffolds: Promising platform for bone tissue engineering. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 13, p. 1745–1759, 2017.

BELOTI M. M.; DE OLIVEIRA P. T.; GIMENES R.; ZAGHETE M. A.; BERTOLINI M. J.; ROSA A.L. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*, v. 79, p. 282–288, 2006.

BLAIR, H.; LARROUTURE, Q. C.; LI, Y.; LIN, H.; BEER-STOLTZ, D.; LIU, L.; NELSON, D. J. Osteoblast differentiation and bone matrix formation *in vivo* and *in vitro*. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, v. 23, n. 3, p. 268-280, 2017.

BOSKEY, A. L. Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization. *Bone and mineral*, v. 6, n. 2, p. 111-123, 1989.

BRANDL, F.; SOMMER, F.; GOEPFERICH, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, v. 28, n. 2, p. 134-146, 2007.

BROWN, B. N.; VALENTIN, J. E.; STEWART-AKERS, A. M.; MCCABE, G. P.; BADYLAK, S. F. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*, v. 30, n. 8, p. 1482-1491, 2009.

BUCKWALTER, J. A.; HENRY J. M., ALAN J. G. Articular cartilage and osteoarthritis. Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons, v. 54, p. 465-480, 2005.

CHENG, C. W.; SOLORIO, L. D.; ALSBERG, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffold for orthopaedic tissue engineering. Biotechnology advances, v. 32, n. 2, p. 462-484, 2014.

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F. M.; HAYDON, R. C.; PENG, Y.; ZHOU, L.; SZATKOWSKI, J. P. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). Journal of Bone and Joint Surgery, v. 85, n. 8, p. 1544-1552, 2003.

CHOI, M. H.; NOH, W. C.; PARK, J. W.; LEE, J. M.; SUH, J. Y. Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. Journal of periodontal & implant science, v. 41, n. 4, p.167-175, 2011.

CIOFANI, G.; DANTI, S.S; D'ALESSANDRO,D; MOSCATO, S; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Barium titanate nanoparticles: highly cytocompatible dispersions in glycol-chitosan and doxorubicin complexes for cancer therapy, Nanoscale Research Letters, v. 5, n. 7, p. 1093–1101, 2010a.

CIOFANI, G.; DANTI, S.; MOSCATO, S.; ALBERTAZZI, L.; D'ALESSANDRO, D.; DINUCCI, D.; CHIELLINI, F.; PETRINI, M.; MENCIASSI, A. Preparation of stable dispersion of barium titanate nanoparticles: potential applications in biomedicine. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 76, n. 2, p. 535-543, 2010b.

CIOFANI, G.; RICOTTI, L.; CANALE, C.; D'ALESSANDRO, D.; BERRETTINI, S.; MAZZOLAI, B.; MATTOLI, V. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v.102, p. 312-320, 2013.

COULSON-THOMAS, Y. M.; COULSON-THOMAS, V. J.; NORTON, A. L.; GESTEIRA, T. F.; CAVALHEIRO, R. P.; MENEGHETTI, M. C. Z.; NADER, H. B. The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. PloS one, v. 10, n. 6, 2015.

CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.

Da SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites: nanoparticles to tune gel properties. Polymer International, v. 65, n. 3, p. 268-279, 2016.

DALBY, M. J.; GADEGAARD, N.; OREFFO, R. O. Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. Nature materials, v.13, n. 6, p. 558-569, 2014.

DEMIRTAŞ, T. T.; IRMAK, G.; GÜMÜŞDERELIOĞLU, M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. BioFabrication, v. 9, n. 3, 2017.

DIETRICH, C. P.; DIETRICH, S. M. Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Analytical biochemistry*, v. 70, n. 2, p. 645-647, 1976.

FERREIRA, A. M.; GENTILE, P.; SARTORI, S.; PAGLIANO, C.; CABRELE, C.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G. Biomimetic soluble collagen purified from bones. *Biotechnology journal*, v. 7, n. 11, p. 1386-1394, 2012.

FRANZEN, A.; HEINEGÅRD, D. Extraction and purification of proteoglycans from mature bovine bone. *Biochemical journal*, v. 224, n. 1, p. 47-58, 1984.

FRÖHLICH, M.; GRAYSON, W. L.; MAROLT, D.; GIMBLE, J. M.; KREGAR-VELIKONJA, N.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in perfusion bioreactor culture. *Tissue Engineering Part A*, v. 16, n. 1, p. 179-189, 2010.

GOTHARD, D.; SMITH, E. L.; KANCZLER, J. M.; BLACK, C. R.; WELLS, J. A.; ROBERTS, C. A.; ROJO, L. In Vivo Assessment of Bone Regeneration in Alginate/Bone ECM Hydrogels with Incorporated Skeletal Stem Cells and Single Growth Factors. *PloS one*, v. 10, n. 12, 2015.

GREENWALD, A. S.; BODEN, S. D.; GOLDBERG, V. M.; KHAN, Y.; LAURENCIN, C. T.; ROSIER, R. N. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 83, p. 98-103, 2006.

GUILLE, M. M. G.; MOSSER, G.; HELARY, C.; EGLIN, D. Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials. *Micron*, v. 36, n. 7, p. 602-608, 2005.

HENKEL, J.; WOODRUFF, M. A.; EPARI, D. R.; STECK, R.; GLATT, V.; DICKINSON, I. C.; HUTMACHER, D. W. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions—a 21st century perspective. *Bone research*, v. 1, n.3, p. 216-248, 2013.

HWANG, Y. J.; LYUBOVITSKY, J. G. The structural analysis of three-dimensional fibrous collagen hydrogels by raman microspectroscopy. *Biopolymers*, v. 99, n. 6, p. 349-356, 2013.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p.2328-2337, 2017.

LARA, J. P. H.; PÉREZ LABRA, M.; BARRIENTOS HERNÁNDEZ, F. R.; ROMERO SERRANO, J. A.; ÁVILA DÁVILA, E. O.; THANGARASU, P.; HERNÁNDEZ RAMIREZ, A. Structural Evolution and Electrical Properties of BaTiO₃ Doped with Gd³⁺. *Materials Research*, v. 20, n. 2, p. 538-542, 2017.

LI, Y.; DAI, X.; BAI, Y.; LIU, Y.; WANG, Y.; LIU, O.; DENG, X. Electroactive BaTiO₃ nanoparticle-functionalized fibrous scaffolds enhance osteogenic differentiation of

mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 12, p. 4007–4018, 2017.

MARCUS, R.; FELDMAN, D.; NELSON, D.; ROSEN, C. J. *Fundamentals of osteoporosis*. Academic Press, v. 2009.

PADUANO, F.; MARRELLI, M.; WHITE, L. J.; SHAKESHEFF, K. M.; TATULLO, M. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on hydrogel scaffolds derived from decellularized bone extracellular matrix and collagen type I. *PloS one*, v. 11, n. 2, 2016.

RYGULA, A.; MAJZNER, K.; MARZEC, K. M.; KACZOR, A.; PILARCZYK, M.; BARANSKA, M. Raman spectroscopy of proteins: a review. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 44, n. 8, p. 1061-1076, 2013.

ROBEY, P. G. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. *Principles of bone biology*, v. 1, p. 225-237, 2002.

ROMANO, N. H.; SENGUPTA, D.; CHUNG, C.; HEILSHORN, S. C. Protein-engineered biomaterials: nanoscale mimics of the extracellular matrix. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1810, n. 3, p. 339-349, 2011.

RUGGERI, A.; PRATI, C.; MAZZONI, A.; NUCCI, C.; DI LENARDA, R.; MAZZOTTI, G.; BRESCHI, L. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Archives of oral biology*, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SAWKINS, M. J.; BOWEN, W.; DHADDA, P.; MARKIDES, H.; SIDNEY, L. E.; TAYLOR, A. J.; WHITE, L. J. Hydrogels derived from demineralized and decellularized bone extracellular matrix. *Acta biomaterialia*, v. 9, n. 8, p. 7865-7873, 2013.

SERRA-GÓMEZ, R.; DREISS, C. A.; GONZALEZ-BENITO, J.; GONZÁLEZ-GAITANO, G. Structure and Rheology of Poloxamine T1107 and its Nanocomposite Hydrogels with Cyclodextrin-Modified Barium Titanate Nanoparticles. *Langmuir*, v. 32, n. 25, p. 6398-6408, 2016.

Da SILVA, M. A.; DREISS, C. A. Soft nanocomposites: nanoparticles to tune gel properties. *Polymer International*, v. 65, n. 3, p. 268-279, 2016.

SMITH, E. L.; KANCZLER, J. M.; GOTHARD, D.; ROBERTS, C. A.; WELLS, J. A.; WHITE, L. J.; ROJO, L. Evaluation of skeletal tissue repair, Part 1: Assessment of novel growth-factor-releasing hydrogels in an ex vivo chick femur defect model. *Acta biomaterialia*, v. 10, n. 10, p. 4186-4196, 2014. a.

SMITH, E. L.; KANCZLER, J. M.; GOTHARD, D.; ROBERTS, C. A.; WELLS, J. A.; WHITE, L. J.; ROJO, L. Evaluation of skeletal tissue repair, Part 2: Enhancement of skeletal tissue repair through dual-growth-factor-releasing hydrogels within an ex vivo chick femur defect model. *Acta biomaterialia*, v. 10, n. 10, p. 4197-4205, 2014. b.

SROGA, G. E.; KARIM, L.; COLÓN, W.; VASHISHTH, D. Biochemical characterization of major bone-matrix proteins using nanoscale-size bone samples and proteomics methodology. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 10, n. 9, p. M110-006718, 2011.

STERN, M. M.; MYERS, R. L.; HAMMAM, N.; STERN, K. A.; EBERLI, D.; KRITCHEVSKY, S. B.; VAN DYKE, M. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. *Biomaterials*, v. 30, n. 12, p. 2393-2399, 2009.

SWINEHART, I. T.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix bioscaffold in tissue remodeling and morphogenesis. *Developmental Dynamics*, v. 245, n. 3, p. 351-360, 2016.

TAN, S.; FANG, J. Y.; YANG, Z.; NIMNI, M. E.; HAN, B. The synergetic effect of hydrogel stiffness and growth factor on osteogenic differentiation. *Biomaterials*, v. 35, n. 20, p. 5294-5306, 2014.

TIBBITT, M. W.; ANSETH, K. S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*, v. 103, n. 4, p. 655-663, 2009.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

VAN WIJK, X. M.; VALLEN, M. J.; VAN DE WESTERLO, E. M.; OOSTERHOF, A.; HAO, W.; VERSTEEG, E. M.; SCHALKWIJK, J. Extraction and structural analysis of glycosaminoglycans from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Glycobiology*, v. 22, n. 12, p. 1666-1672, 2012.

VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International journal of biological macromolecules*, v. 72, p. 269-281, 2015.

WATT, F. M.; HUCK, W. T. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 14, n. 8, p. 467-473, 2013.

WENDEL, M.; SOMMARIN, Y.; HEINEGÅRD, D. Bone matrix proteins: isolation and characterization of a novel cell-binding keratan sulfate proteoglycan (osteoaderin) from bovine bone. *The Journal of cell biology*, v. 141, n. 3, p. 839-847, 1998.

ZHANG, Y.; CHEN, L.; ZENG, J.; ZHOU, K.; ZHANG, D. Aligned porous barium titanate/hydroxyapatite composites with high piezoelectric coefficients for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 39, p. 143-149, 2014.

5 CAPITULO 4: EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-IL-1 β -scFab EM *N. benthamiana*

5.1 INTRODUÇÃO

5.1.1 EXPRESSÃO DE ANTICORPOS RECOMBINANTES

Anticorpos recombinantes vêm sendo expressos em diferentes formatos e organismos, com diversas finalidades. O uso terapêutico de anticorpos para o tratamento de câncer já é um mercado que movimenta bilhões de dólares anualmente (ARBABI-GHAHROUDI et al., 2005; SLIWKOWSKI e MELLMAN, 2013, CHAN et al, 2016). Em 2013 a venda de anticorpos monoclonais movimentou mundialmente aproximadamente 75 bilhões de dólares (ECKER et al., 2015).

Todos os esforços em torno destes trabalhos buscam o desenvolvimento de anticorpos recombinantes com alta afinidade, especificidade e solubilidade, estabilidade do *cassete* de expressão no hospedeiro e da proteína recombinante em si e também um sistema de expressão de baixo custo e alto rendimento (ARBABI-GHAHROUDI et al., 2005).

A expressão do anticorpo é influenciada tanto por fatores intrínsecos como sequência gênica, eficiência da transcrição e tradução e dobramento da proteína como pelas condições extrínsecas como condições de crescimento do hospedeiro (ARBABI-GHAHROUDI et al., 2005). O tamanho da proteína produzida pode ser um limitante da técnica. Proteínas grandes, como anticorpos completos, podem dificultar o dobramento correto. Sabe-se que reduzir o tamanho e a complexidade do anticorpo pode diminuir a ocorrência de diversos problemas que podem acontecer na expressão *in vivo*, como baixo rendimento, dobramento da proteína incorreto, baixa solubilidade e estabilidade térmica e conformacional (BATRA et al., 2002; ARBABI-GHAHROUDI et al., 2005).

Domínios funcionais de anticorpos, como fragmento variável (Fv) e Fab, retem a capacidade de ligação aos antígenos, tem maior capacidade de penetração

nos tecidos e causam menos resposta imune em humanos que anticorpos inteiros possibilitando sua utilização para diversos fins (NEUBERGER et al. 1983; GUPTA e SHUKLA, 2017). *Single-Chain Fv* (scFv) e Fab são dois tipos de fragmentos usados com frequência. O formato Fab é mais estável, já o scFv é menos estável, sendo degradado por proteases que dissociam as duas cadeias (BIRD e WALKER, 1991; WORN et al., 2001).

Qi et al. (2014) testaram o anti-IL-1 β nas formas scFv, Fab e o completo em camundongos no modelo de artrite reumatoide. Comparando a eficácia terapêutica das três formas de anti-IL-1 β , percebeu-se que o anti-IL-1 β -ScFv foi menos eficaz que os outros dois tratamentos, já entre o anti-IL-1 β -Fab e o anti-IL-1 β -completo não houve diferença significativa. Levando em consideração que a produção de um anticorpo completo é mais complexa, a porção Fab seria a mais indicada para uso terapêutico.

O uso de um *linker* para ligar a cadeia leve e a pesada do fragmento Fab, formando um scFab, também já foi utilizado com sucesso, aumentando a produção do anticorpo e a capacidade de ligação a antígeno 100 vezes maior, quando comparado ao fragmento Fab, sem *linker* (HUST et al, 2007).

Uma das plataformas de produção de proteínas recombinantes utiliza bactérias, principalmente *E. coli*. No entanto, a produção de proteínas grandes e complexas, como anticorpos, é limitada, pois em procariotos não há maquinaria de modificações pós-traducionais (ELGUNDI et al., 2016).

Outro método utilizado para produzir proteínas recombinantes utiliza células de mamíferos, principalmente quando se trata da produção de proteínas que necessitam modificações pós-traducionais. Em relação às bactérias, há a desvantagem do crescimento lento das células em cultura, alto custo e baixa produtividade (DIETMAIR et al., 2012).

Utilizando a produção de proteínas em plantas em larga escala, o custo pode ser diminuído de 2% a 10% em relação à produção em bactérias e em até 1.000 vezes em relação à produção em plataformas que utilizam células de mamíferos (NANDI e KHUSH, 2015). E além da diminuição dos custos, há outros benefícios quando comprado com os outros sistemas, como segurança, qualidade da produção e eficiência do dobramento da proteína (ZHANG et al, 2017)

Neste setor, os primeiros produtos comercializados foram a avidina e tripsina, produzidas em grão de milho e IgA, produzida em folha de tabaco (WILKEN e NIKOLOV, 2012).

5.1.2 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM PLANTAS

O uso de plantas para produção de proteínas recombinante tem-se mostrado uma alternativa interessante ao uso de plataformas que utilizam animais, células animais ou bacterianas. As plantas unem a capacidade de fazer processamento pós-traducional e baixo risco de contaminação por patógenos animais e outras impurezas (MARCONI e ALVAREZ, 2014; VASILEV et al., 2015; ZHANG et al, 2017; BUYEL et al, 2017).

Na produção de anticorpos para terapia faz-se necessário que o dobramento e a montagem da proteína ocorram de forma correta, o que implica em haver formação correta de pontes dissulfeto e glicosilação. A glicosilação influencia na estabilidade e na interação com o antígeno. Para contornar este problema, o anticorpo é direcionado para a via de secreção e também há estratégias de glicoengenharia como a inibição de glicosiltransferases específicas de plantas e/ou adição de específicas de animais (VASILEV et al., 2015).

A produção de fármacos recombinantes em plantas vem sendo feita desde 1989, no entanto o primeiro produto comercial foi lançado em 2012. Esse distanciamento entre a pesquisa e a comercialização ocorreu principalmente devido à resistência da indústria farmacêutica, à opinião pública e agências reguladoras. A indústria farmacêutica é conservadora, focando seus investimentos em poucas plataformas bem estabelecidas, faltando investimentos em novas técnicas, como *molecular farming* (FISCHER et al., 2013). Atualmente já está estabelecida e expressão de diversos anticorpos em plantas (MARCONI e ALVAREZ, 2014; VASILEV et al., 2015; LIANG et al., 2016).

A expressão de anticorpos em plantas pode ser feita de duas maneiras: estável e transiente. Na transformação estável o transgene é inserido no genoma nuclear ou plastidial da planta. Já na transformação transiente não há integração do

transgene, este permanece transcricionalmente ativo por alguns dias (KOMAROVA et al, 2010; FISCHER et al., 2013; MARCONI e ALVAREZ, 2014), com a produção de proteína podendo chegar a mg/planta em poucos dias (FISCHER et al., 2013).

5.1.3 EXPRESSÃO TRANSIENTE EM PLANTAS

Na expressão transiente de proteínas recombinantes não há integração do transgene no genoma nuclear ou no plastidial e a transcrição do DNA pode ocorrer por alguns dias (KOMAROVA et al, 2010; FISCHER et al., 2013; MARCONI e ALVAREZ, 2014).

Algumas das vantagens da expressão transientes em relação à produção em plantas transgênicas é a diminuição do tempo de obtenção do produto, que pode ser reduzido, dependendo do modelo, de 24 meses para 14 a 20 dias (WILKEN e NIKOLOV, 2012) e a diminuição do custo de produção e alto rendimento (FISCHER et al., 2013, FAHAD et al., 2015). Adicionalmente, a expressão transiente é considerada segura, evitando alguns problemas como os relacionados à dispersão de sementes e/ou pólen de plantas transgênicas (POGUE et al., 2010).

Um dos recursos disponíveis para a inserção do transgene na célula da planta é o uso da *Agrobacterium*. Esta bactéria é capaz de infectar até 96% das células da folha que sofreu agroinfiltração e a plena expressão de genes pode ser detectada em 3 a 4 dias após infiltração (dpi) (KOMAROVA et al, 2010).

A expressão transiente, baseada em agroinfiltração, de anticorpos funcionais em folhas já foi realizada com sucesso em tabaco (SACK et al. 2015), *N. benthamiana* (MELNIK et al., 2017), alface (MIRZAEI et al., 2017), dentre outros.

A produção do anticorpo anti-IL-1 β -scFab em *N. benthamiana* tem um grande potencial para trazer uma alternativa para o tratamento de artrite reumatoide, visto que o Anakinra® e o Canakinumab® são de alto custo e ainda não estão disponíveis no Brasil.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos recombinantes no formato scFab por expressão transiente em *N. benthamiana*.

5.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir de forma transiente o anticorpo anti-IL-1 β -scFab em *N. benthamiana*;
- Avaliar, *in vitro*, capacidade destes anticorpos de reconhecer o antígeno hIL-1 β , por ELISA.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os materiais utilizados: meio de cultura MS (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), ágar (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Enzimas de restrição (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), agarose (Serva, Heidelberg, Alemanha), antibióticos (Phyto technology, Lenexa, KS, EUA). Coomassie Brilliant Blue R (Serva, Heidelberg, Alemanha), kit para eluir DNA de gel de agarose (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, Madison, Wisconsin, EUA), kit para extração de DNA plasmidial (illustra plasmidPrep Mini Spin Kit GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), marcador de peso molecular 1 Kb (SM0311, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), T4 DNA ligase (NEB, Ipswich, MA, USA), *E. coli* BL21 (NEB, Ipswich, MA, USA), vetor de entrada pENTR 4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vetor de expressão pK7WG2D (VIB, Gent, Bélgica), LR clonasse (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), primers LQR e LQR (IDT, Coralville, Iowa, EUA), GoTaq DNA polimerase e tampão (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), MgCl₂ Promega, Madison, Wisconsin, EUA), dNTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), Albumina Bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Soro Fetal Bovino (SFB) (LGC biotecnologia, São Paulo, Brasil), marcador *protein ladder Full Range* (RPN800E, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), Amicon Ultra-15 (Millipore, Burlington, Massachusetts, EUA), membrana de nitrocelulose (Hybond ECL 0,2 µm de porosidade, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), anti-His monoclonal IgG de camundongo (GE Healthcare Chicago, Illinois, EUA), substrato quimioluminescente (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), filme para revelação (Hyperfilm MP 18 x 24 cm, GE Healthcare, Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), coluna de níquel (His-Trap de 5 mL, GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA), OptEIA™ Human IL-1β ELISA Kit II (BD, New Jersey, EUA), Anti-his-peroxidase (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), corante não mutagênico safer (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil).

Os equipamentos utilizados: Centrífuga (5804-R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), centrífuga (mini spin plus, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), câmara de fluxo laminar (1300 series A, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) agitador (Orbital Shaker 420, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), agitador magnético (IKA HS 7, Biovera, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), Freezer -80 °C (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), microscópio de fluorescência (BX 51, Olympus, Tóquio, Japão), espectrofotômetro (Biomate 3, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), Espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), termociclador Eppendorf® Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), fonte eletroforese (EPS 300-IIV, CBS scientific, Cambridge, Reino Unido), transiluminador (GelDoc-It Imager, Analytik Jena, EUA), eletroforese vertical (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), Câmara climática (MLR-351h, Panasonic, Osaca, Japão) GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

5.3.2 MATERIAL VEGETAL

Foi utilizada para expressão do anti-IL-1 β -scFab *Nicotiana benthamiana*. Atualmente as plantas são mantidas *in vitro* no laboratório de Genética e Biotecnologia - UFJF. As sementes foram desinfestadas utilizando-se solução de água e detergente tween 20 por 2 minutos, álcool etílico 70% (v/v) por 30 segundos e solução de hipoclorito de sódio 15% (v/v) por 10 minutos, seguido por cinco lavagens com água deionizada autoclavada. Posteriormente, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri em meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), acrescido de glicose 20 g L⁻¹ e ágar 8 g L⁻¹, pH 5,8, em sala de crescimento a 25 \pm 2 °C, com fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro) e 30 μ mol fótons m⁻² s⁻¹. As plantas obtidas são mantidas *in vitro* em sala de crescimento e são aclimatizadas e utilizadas para os experimentos de agroinfiltração.

5.3.3 DESENHO DO GENE E MONTAGEM DO VETOR

O gene que codifica o anti-IL-1 β -scFab foi desenhado com base na sequência de aminoácidos e a sequência nucleotídica foi otimizada para produção em plantas, da droga Canakinumab® disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06168>. O vetor de expressão foi desenhado de maneira que o produto final da expressão tem uma cauda de histidina (His-6) e o peptídeo sinal 2S2 de *A. thaliana*, que direciona a proteína para o apoplasto. O peptídeo de ligação entre a cadeia leve e a cadeia pesada da porção Fab foi desenhado de acordo com Hust et al. (2007). A sequência codificadora do anti-IL-1 β -scFab foi sintetizada no vetor pUCIDT-KAN flanqueada pelos sítios de restrição de *Nco*I e *Xho*I.

A digestão de 150 ng do plasmídeo pUCIDT-KAN- anti-IL-1 β -scFab e de 60 ng do vetor de entrada pENTR-4 foi feita com 5 U de *Nco*I e 5 U de *Xho*I, por 1 hora a 37°C. Em seguida foi feita a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão Tris-Boro-EDTA (TBE) (1x). As bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram sacadas (pENTR-4- 2.400 pb e anti-IL-1 β -scFab- 1.500 pb) o DNA purificado utilizando kit para eluição de bandas de acordo com as instruções do fabricante. O marcador de peso utilizado foi 1 Kb *ladder*. Em seguida foi feita a ligação do pENTR-4 e anti-IL-1 β -scFab. Foram utilizados 60 ng do pENTR-4, 160 ng do anti-IL-1 β -scFab e 400 U de T4 DNA ligase a 4°C *overnight*. Um microlitro da ligação foi utilizado para transformar *E. coli* por choque térmico de acordo com o manual instruções. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo canamicina 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 37°C *overnight*. A colônia obtida foi inoculada em meio LB líquido contendo canamicina 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubada sob agitação a 37°C, 210 rpm, *overnight*. A extração de plasmídeo foi feita utilizando o kit apropriado, de acordo com as instruções do fabricante, e a quantificação plasmidial foi feita utilizando nanodrop. Então, 170 ng do plasmídeo então denominado pENTR-anti-IL-1 β -scFab foi utilizado para subclonagem no vetor pK7WG2D, utilizando a enzima LR de acordo com manual de instruções. Em seguida, 5 μL foram utilizados para transformar *E. coli* e as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido

contendo espectinomicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. As colônias obtidas foram inoculadas em meio LB líquido contendo espectinomicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas sob agitação a 37°C , 210 rpm, *overnight*. A extração de plasmídeo foi feita utilizando o kit apropriado, de acordo com as instruções do Fabricante. Os plasmídeos recuperados foram denominados pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab (Figura 30). No vetor há os genes de seleção *nptII* (resistência ao antibiótico canamicina para a planta) e gene *reporter* GFP (*green fluorescence protein*), que codifica uma proteína para visualização de fluorescência verde.

A fim de confirmar a inserção da sequência codificadora do anti-IL-1 β -scFab no vetor de expressão foi feita uma reação da polimerase em cadeia (PCR) com primers que flanqueiam a região de inserção do transgene no vetor de expressão *forward* LRQF (5'TACCCGGGGATCCTCTAGAG3') e *reverse* LRQR (5'CGGCCGCACT AGTGATATCA3') a $0,5 \mu\text{M}$, utilizando 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, tampão (1x), MgCl_2 1,5 mM, dNTP mix 0,4 mM, 0,2 U GoTaq DNA polimerase. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) a 100 mV com o marcador de 1 kb *ladder*.

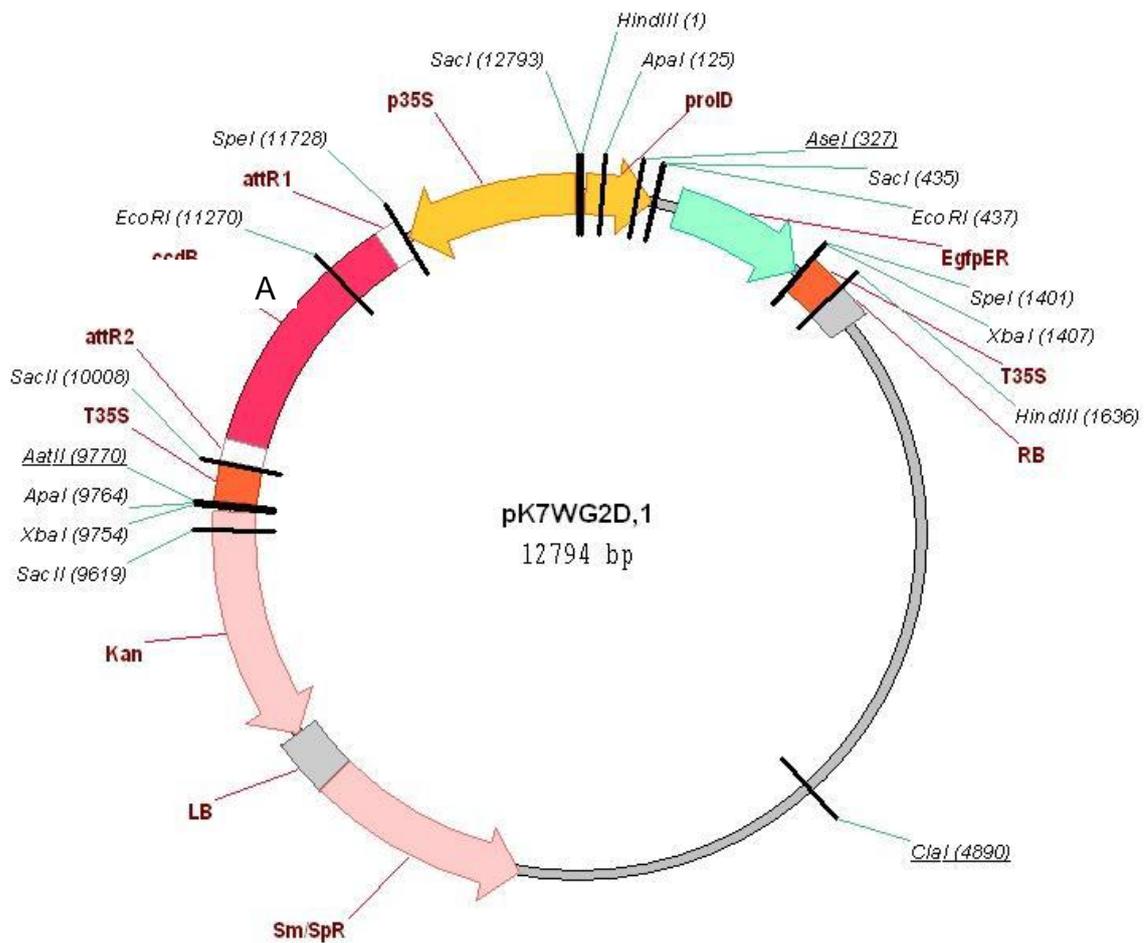


Figura 30: Vetor de expressão pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab. Esquema do vetor: <https://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pK7WG2/search/index/overexpression/any>, acessado em 08/01/18.

5.2.4 PREDIÇÃO ESTRUTURAL

A predição estrutural foi feita em parceria com o Programa de pós-graduação em Modelagem Computacional da UFJF. A sequência de aminoácidos contendo o *linker* de glicina unindo as cadeias leve e pesada do anticorpo anti-IL-1 β -scFab foi montada a partir da sequência scFab da droga Canakinumab®. Esta sequência modificada foi alinhada contra o banco de dados PDB (*protein data bank*) de estruturas preditas por métodos experimentais (difração de raio X e ressonância nuclear magnética) usando o software blastp. O alinhamento foi necessário para

obtenção de estruturas de referência (*templates*) com valor de similaridade e identidade satisfatórios para a predição estrutural *in silico* da proteína recombinante proposta neste trabalho.

A estrutura tridimensional do anti-IL-1 β -scFab foi construída utilizando modelagem comparativa (*template based*) utilizando como referência a estrutura cristalográfica da proteína de código PDB 4G5Z. Esta molécula é um fragmento do anticorpo terapêutico anti-IL-1 β (canakinumab®), o qual contém a porção scFab de interesse. Após a seleção da estrutura de referência, foi realizado um alinhamento global entre a sequência de aminoácidos da molécula-alvo com o *template* utilizando o algoritmo clustalW. Tal alinhamento foi submetido ao *software* Modeller9v19, no qual foram obtidos 10 modelos tridimensionais para a anti-IL-1 β -scFab.

Todos os modelos contruídos foram avaliados utilizando os programas Procheck e Molprobitry para análise da qualidade estereoquímica. Os valores de energia foram analisados utilizando os valores nDOPE e Molpdf calculados pelo Modeller9v19.

5.2.5 ESTABELECIMENTO DE LINHAGEM TRANSFORMADA DE *Agrobacterium*

O plasmídeo recombinante denominado pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab foi inserido por eletroporação na linhagem de *Agrobacterium* GV3101. A linhagem de *Agrobacterium* foi cultivada em meio Lysogny broth (LB) sólido, contendo triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, cloreto de sódio 10 g L⁻¹, ágar 7 g L⁻¹ e os antibióticos rifampicina 50 μ g mL⁻¹, gentamicina 50 μ g mL⁻¹ e espectinomicina 75 μ g mL⁻¹ por 2 dias a 28°C. Foi feito um inóculo de uma colônia isolada em LB suplementado com antibióticos. O inóculo foi incubado a 28° C por 24 horas e em seguida, as bactérias foram devidamente armazenadas em glicerol 10% em freezer - 80 ° C.

5.3.6 EXPRESSÃO TRANSIENTE EM *N. benthamiana*

No dia 1 foi feito o inóculo de uma única colônia *Agrobacterium* GV3101-pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab em LB contendo rifamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, gentamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e canamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a 28° C, por 24 horas a 210 rpm. No dia 2, em um tubo de 50 mL, 100 μL do inóculo foram colocados em 7,5 mL LB contendo MES 10 mM, pH 5.85, acetoceringona (AS) 20 μM , rifamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, gentamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e canamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a 28° C, por 24 horas a 210 rpm. No dia 3 o inóculo foi centrifugado a 4.500 g por 15 minutos, a temperatura ambiente, o *pellet* foi ressuspenso em tampão de agroinfiltração (10 mM MES, pH 5.8, 200 μM AS) para a OD₆₀₀ 0.8 e incubado a temperatura ambiente por 3 a 5 horas.

Foi utilizada para a infiltração juntamente com a *Agrobacterium* pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab, a *Agrobacterium* EHA101-TCV-CP, que expressa a A proteína de revestimento do capsídeo viral do vírus *Turnip crinkle* (TCV-CP), supressora de silenciamento que aumenta o rendimento da proteína de interesse. Para infiltração foram misturados volumes iguais de cada linhagem.

A fim de determinar o melhor dpi para coleta das folhas, foi feita a observação do gene *reporter* GFP. Foram feitas observações 3, 5 e 6 dpi.

5.3.7 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

As folhas agroinfiltradas foram maceradas em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido. O macerado foi recuperado, transferido para tubos de centrífuga e ressuspenso em tampão de extração (Tris-HCl 5 mM, Sacarose 8% (p/v), PMSF (2 mM), Leupeptina (10 μM), pepstatina (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e inibidor de tripsina (50 $\mu\text{g L}^{-1}$). Foi utilizado menor volume possível de tampão, apenas suficiente para cobrir as amostras. Em seguida o macerado foi centrifugado a 4500 g por 20 minutos, sendo o sobrenadante, utilizado como fonte de proteína. Todas as etapas necessárias ao

processo foram executadas a 4^o C. A dosagem do extrato proteico bruto foi feito pelo método de Bradford (1956) após 6 dpi.

5.3.8 ELETROFOSE EM GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE (do inglês, Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel) foi feito seguindo os procedimentos descritos por Sambrook e Russel (2001) de acordo com Laemmli (1970). A proteína total foi dosada pelo método de Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão. Para a separação no gel foram utilizados 100 µg de proteína total diluídos em tampão de corrida 4x (Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, SDS 20%, β-mercaptoetanol, Glicerol 250 mM, Azul de Bromofenol). As amostras foram fervidas por 10 minutos antes de serem aplicadas no gel. O gel concentrador utilizado foi a 4% (1,1 mL água deionizada, 1 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 330 µL de Bis-acrilamida 30% (p/v), 20µL de SDS 10% (p/v), 20µL Persulfato de amônio 10% (p/v), 2µL de TEMED). O gel separador a 12% (2 mL água deionizada, 1,3 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, 1,6 mL de Bis-acrilamida 30% (p/v), 20 µL de SDS 10% (p/v), 20 µL Persulfato de amônio 10% (p/v), 4 µL de TEMED). As proteínas foram separadas por eletroforese vertical a uma corrente de 30 mA.

5.3.9 COLORAÇÃO DO SDS-PAGE

Para coloração de Coomassie o gel foi fixado em uma solução de ácido acético 10% (v/v) e etanol 40% (v/v) por 30 minutos. Em seguida o gel foi corado *overnight* solução coomassie brilliant blue 0,2% (p/v). Então foi feita a descoloração do gel com ácido acético 10% (v/v) e etanol 40%(v/v). A solução foi trocada até que as bandas ficassem em evidência.

Para coloração de prata o gel foi fixado com uma solução de etanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formol 0,04%(v/v) por 1 hora. Em seguida foram

feitas 3 lavagens de 20 minutos com etanol 50% (v/v). Então o gel foi pré-tratado com tiosulfato de sódio ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), lavado 2 vezes com água destilada e impregnado com solução de prata 0,1% (p/v) por 20 minutos. O desenvolvimento da cor foi feito com solução de carbonato de sódio 6% (p/v), formol 0,05% (v/v) e tiosulfato de sódio ($4 \cdot 10^{-6} \text{ g L}^{-1}$). A reação foi parada com solução de etanol 50% (v/v) e ácido acético 12% (v/v).

5.3.10 WESTERN-BLOT

Após a corrida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose a 100 mA por 45 minutos. Após a eletrotransferência a membrana bloqueada foi por 1 hora e 30 minutos em solução tampão de PBS (1x), pH 7.6, contendo caseína 3% (p/v) e tween 20 0,1% (v/v). A membrana foi incubada *overnight* com anticorpo primário anti-his (1:1.000) em solução de bloqueio. A membrana foi lavada com PBS e tween 20 0,1% (v/v) e em seguida somente com PBS. Então a membrana foi incubada com anticorpo secundário diluído em PBS (1:2.000) por 1 hora e 30 minutos. Os blots foram revelados com substrato quimioluminescente de acordo com instruções do Fabricante e expostos ao filme da GE Healthcare. O extrato proteico de uma planta infiltrada com tampão somente foi utilizado como controle negativo.

5.3.11 PURIFICAÇÃO DO ANTICORPO

A purificação do anticorpo foi realizada por afinidade com íons metálicos imobilizados cromatografia (IMAC) numa coluna níquel utilizando tampão de ligação imidazol (20 mM) e eluída com tampão de eluição de imidazol (500 mM). A dosagem da proteína purificada foi feita pelo método de Lowry et al. (1951). Foram coletadas frações de 2 mL e foi feito um ensaio de eletroforese em gel de acrilamida (SDS-

PAGE) para verificar a pureza das frações. A primeira fração passou a ser descartada por apresentar impurezas e então se juntou o volume das demais frações e a desanilização foi feita utilizando uma coluna Amicon Ultra-15, de acordo com instruções do Fabricante.

5.3.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RECONHECIMENTO DO ANTÍGENO

A fim de avaliar se o anticorpo produzido em *N. benthamiana* é capaz de reconhecer a citocina IL-1 β , foi realizado um ensaio de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay-ELISA) sanduíche utilizando o kit para detecção da IL-1 β , com modificações. Para tanto, uma placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo de captura, de acordo com as instruções do Fabricante: diluição 1:250 no tampão de *coating*, *overnight* a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS e Tween 20 0,05% (v/v) e bloqueada com SFB 10% (v/v) diluído em PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foram feitas lavagens PBS e Tween 20 0,05% (v/v) e então foi adicionada a IL-1 β : 2.000 pg, 1.000 pg, 500 pg e 250 pg por poço, diluída em PBS e Tween 20 0,05% (v/v) e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. A placa foi lavada com PBS e Tween 20 0,05% (v/v). Foi então adicionado o anticorpo produzido anti-IL-1 β -scFab a 0,01 μ M, 0,1 μ M, 0,5 μ M e 1 μ M a cada poço com quantidades diferentes de IL-1 β . A placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida foi adicionado o anticorpo de revelação anti-His-peroxidase. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 2 horas. A reação antígeno-anticorpo foi detectada adicionando-se o substrato TMB e H₂O₂. A reação foi interrompida com 50 μ L de H₂SO₄. Em seguida foi medida a absorbância à densidade óptica 450 nm em espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em quadruplicata. A análise estatística foi feita por one-way ANOVA, seguida do teste de Tukey.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 DESENHO DO GENE E PREDIÇÃO ESTRUTURAL

O modelo gerado pela predição estrutura mostrou a sequencia desenhada e otimizada a partir da sequência de aminoácidos do anticorpo que compõe o medicamento Canakinumab® (disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB06168>) e o peptídeo de ligação entre a cadeia leve e a cadeia pesada da porção Fab, (Figura 31).

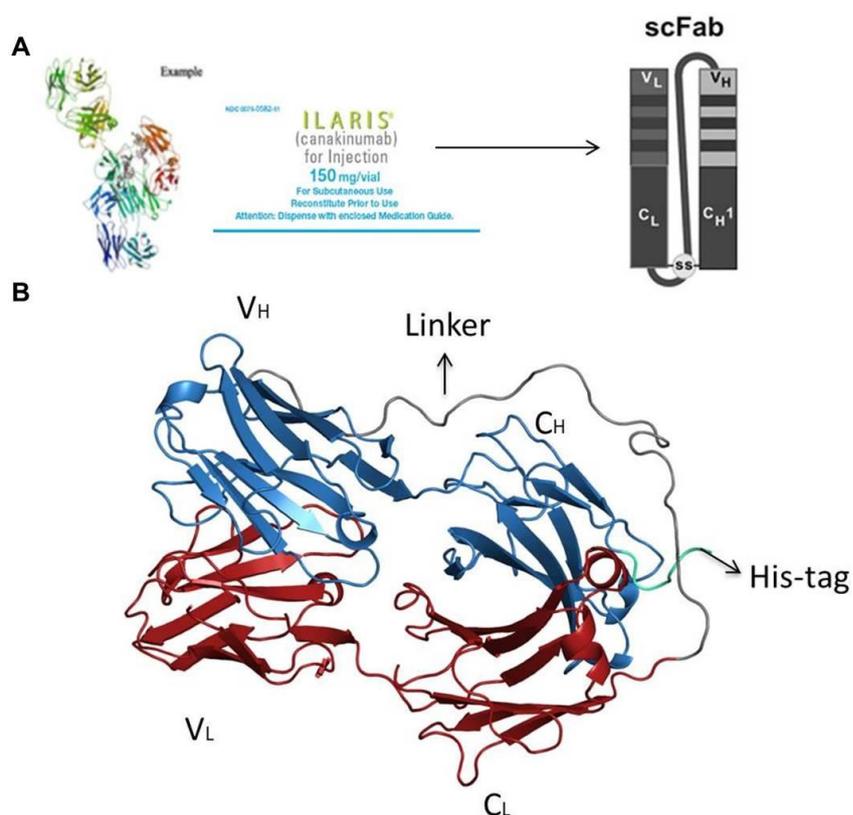


Figura 31: (A) Estrutura do anticorpo que compõe o medicamento comercial Canakinumab®, a esquerda e esquema de um anticorpo no formato scFab, a direita. Fonte do esquema: Hust et al., 2007. (B) modelo do anticorpo anti-IL-1 β -scFab feito no *software* Modeller9v19.

5.4.2 CONSTRUÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO pK7WG2D-ANTI-IL-1 β -scFab

A Figura esquemática com o pK7WG2D com o *cassete* de expressão do anti-IL-1 β -scFab recombinante (1.500 pb) é mostrado na Figura 32A. A digestão do pUCIDT-KAN- anti-IL-1 β -scFab gerou uma banda no tamanho esperado de 1.500 pb, correspondente do gene anti-IL-1 β -scFab e a digestão do vetor pENTR4 gerou uma banda no tamanho esperado de 2.400 pb (Figura 32B). Após a ligação dos fragmentos com a T4 DNA ligase, foram obtidos quatro clones. A PCR feita a fim de confirmar inserção do fragmento de interesse no vetor de expressão. Nos *lanes* 1, 2, 3, 4 é mostrado o produto da PCR dos clones com tamanho aproximado de 1.500 pb e no *lane* 5 o produto da PCR do vetor pK7WG2D com gene *ccdb* com tamanho aproximado de 2.000 pb.

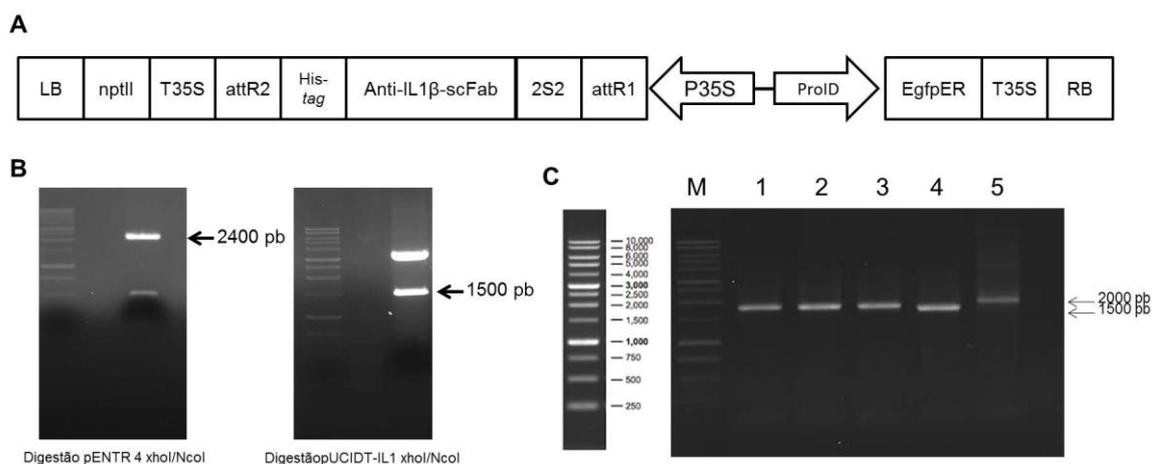


Figura 32: (A) Mapa esquemático do pK7WG2D com o *cassete* de expressão do anti-IL-1 β -scFab recombinante. (B) Imagem da eletroforese em gel de agarose dos produtos da digestão do pENTR4 e do pUCIDT-KAN- anti-IL-1 β -scFab com *XhoI* e *NcoI*. (C) Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR do pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab (*lanes* 1, 2, 3 e 4) e pK7WG2D vazio (*lane* 5).

5.4.3 EXPRESSÃO DO ANTICORPO ANTI-IL-1 β -scFab

Após 3 dias da infiltração foi possível observar expressão de GFP, caracterizada pela coloração verde brilhante. Nos dias subsequentes observou-se

que houve aumento da coloração verde brilhante até o dia 6, quando as folhas foram coletadas para extração proteica (Figura 33 e 34).

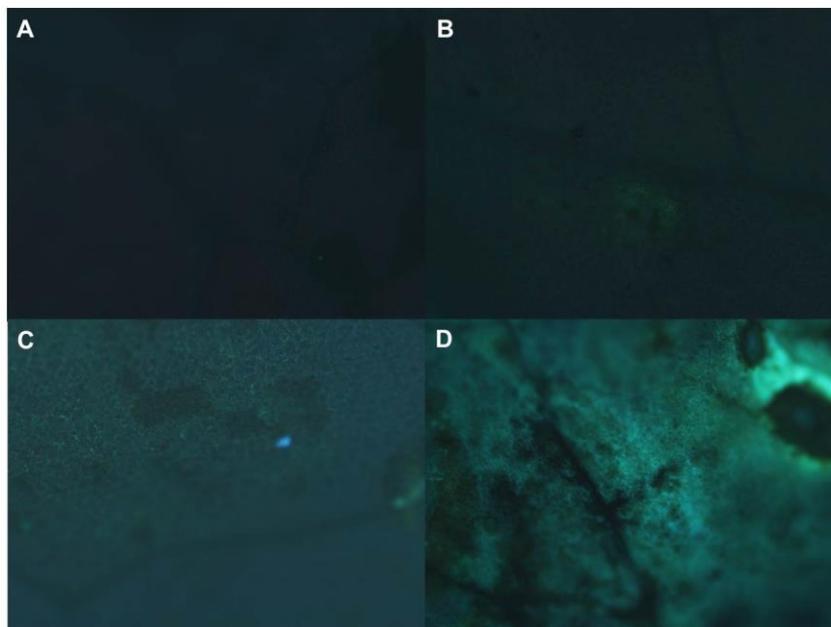


Figura 33: Imagens representativas da expressão da GFP em plantas infiltradas. (A) planta controle, infiltrada somente com tampão, e planta infiltrada com *Agrobacterium*-pK7GW2D-anti-IL-1 β -scFab após (B) 3 dpi, (C) 5 dpi e (D) 6 dpi. Aumento 4x.

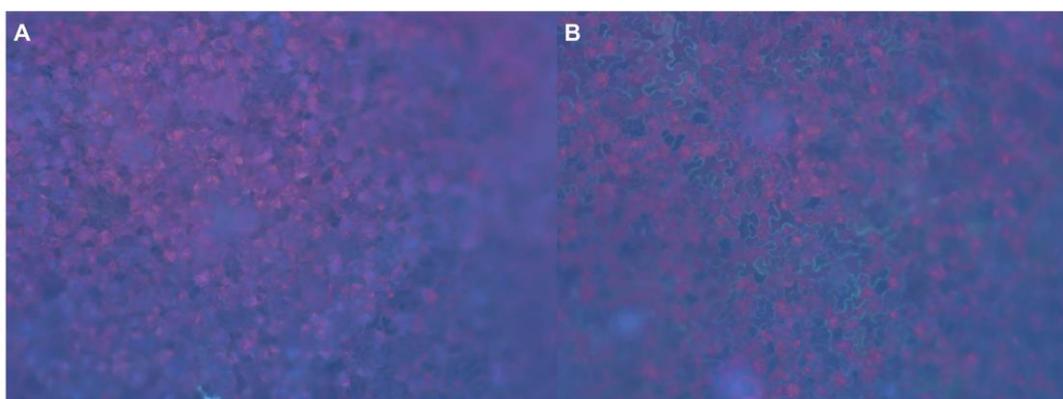


Figura 34: Acúmulo de GFP no apoplasto. (A) planta infiltrada com tampão e (B) planta infiltrada com *Agrobacterium*-pK7GW2D-anti-IL-1 β -scFab, 3 dpi.

Um ensaio *western blot* foi feito para detectar a presença do anti-IL-1 β -scFab no extrato proteico bruto após 3, 5 e 6 dpi (Figura 35A). Após a purificação, foi feito um ensaio de SDS-PAGE das frações coletadas. O gel foi corado com coomassie blue (Figura 35B) e, em seguida com prata (Figura 35C). Após a dessalinização da amostra obteve-se 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após a purificação foi possível detectar a presença do anticorpo anti-IL-1 β -scFab. Uma imagem representativa do

ensaio de western-blot é mostrada na Figura 35D, nos *lanes* 3 e 4 mostra-se anticorpo anti-IL-1 β -scFab .

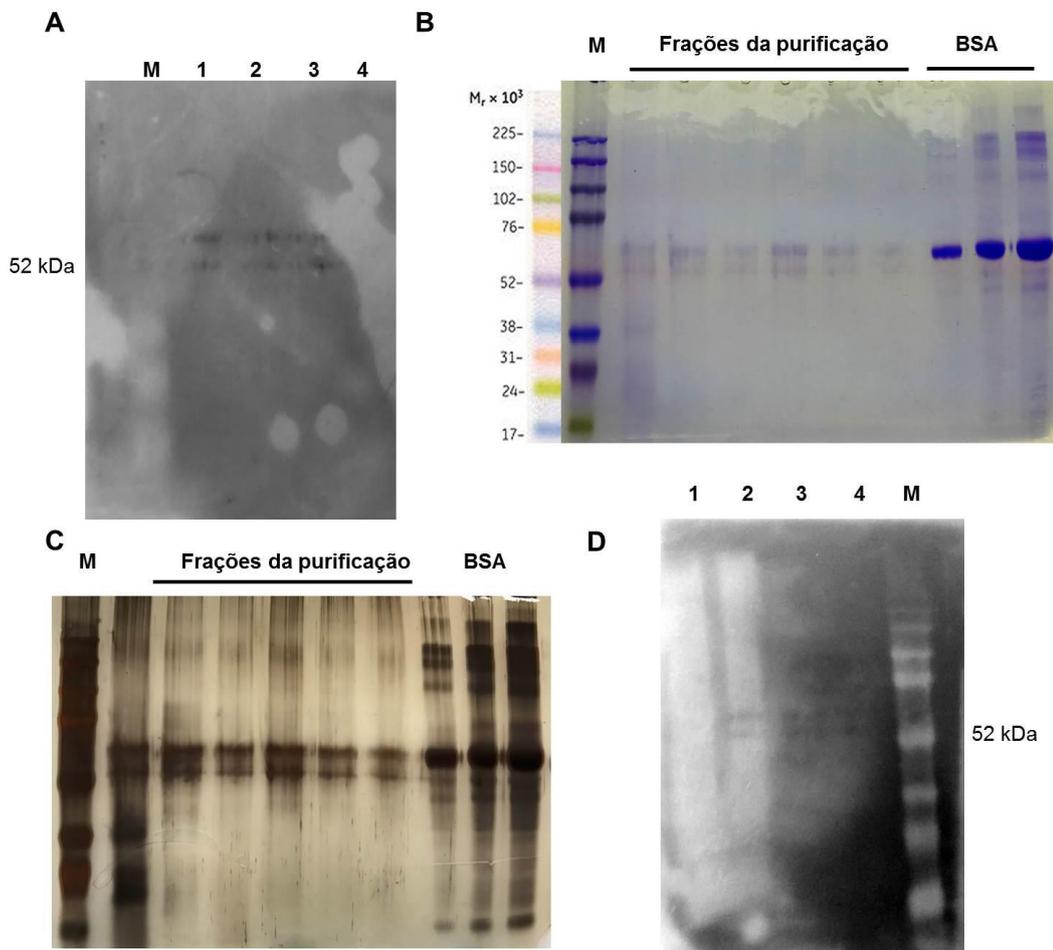


Figura 35: (A) Imagem representativa do ensaio de Western-blot do extrato proteico bruto após 3, 5 e 6 dpi (*lanes* 1, 2, 3, respectivamente) e extrato proteico de planta infiltrada com tampão (*lane* 4). Imagem representativa do SDS-PAGE do anti-IL-1 β -scFab purificado (*lanes* 2 a 6) corado com coomassie (B) e prata (C). (D) Western-blot do anti-IL-1 β -scFab purificado (*lanes* 3 e 4), extrato proteico bruto (*lane* 2) e infiltrada com tampão (*lane* 1).

5.4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE RECONHECIMENTO DO ANTÍGENO

A fim de avaliar se o anticorpo anti-IL-1 β -scFab expresso em *N. benthamiana* é capaz de reconhecer o antígeno IL-1 β , foi feito um ensaio de ELISA sanduíche. Utilizando-se 2.000 pg de IL-1 β houve diferença ($p < 0,05$) na ligação entre 0,01 mM e 1 mM, sendo que houve maior ligação ao antígeno na menor

concentração do anticorpo (Figura 36A). Não houve diferença estatística entre as demais concentrações.

Utilizando-se 1.000 pg de IL-1 β , novamente houve mais ligação ($p < 0,05$) com antígeno na menor concentração de anticorpo (Figura 36B). Já quando foram utilizados 500 pg de IL-1 β não houve diferença na ligação entre as concentrações do anticorpo ($p > 0,05$) (Figura 36C). Já na menor quantidade de IL-1 β , 250 pg, a menor concentração do anticorpo mostrou mais eficiência ($p < 0,05$) na ligação com o antígeno (Figura 36D).

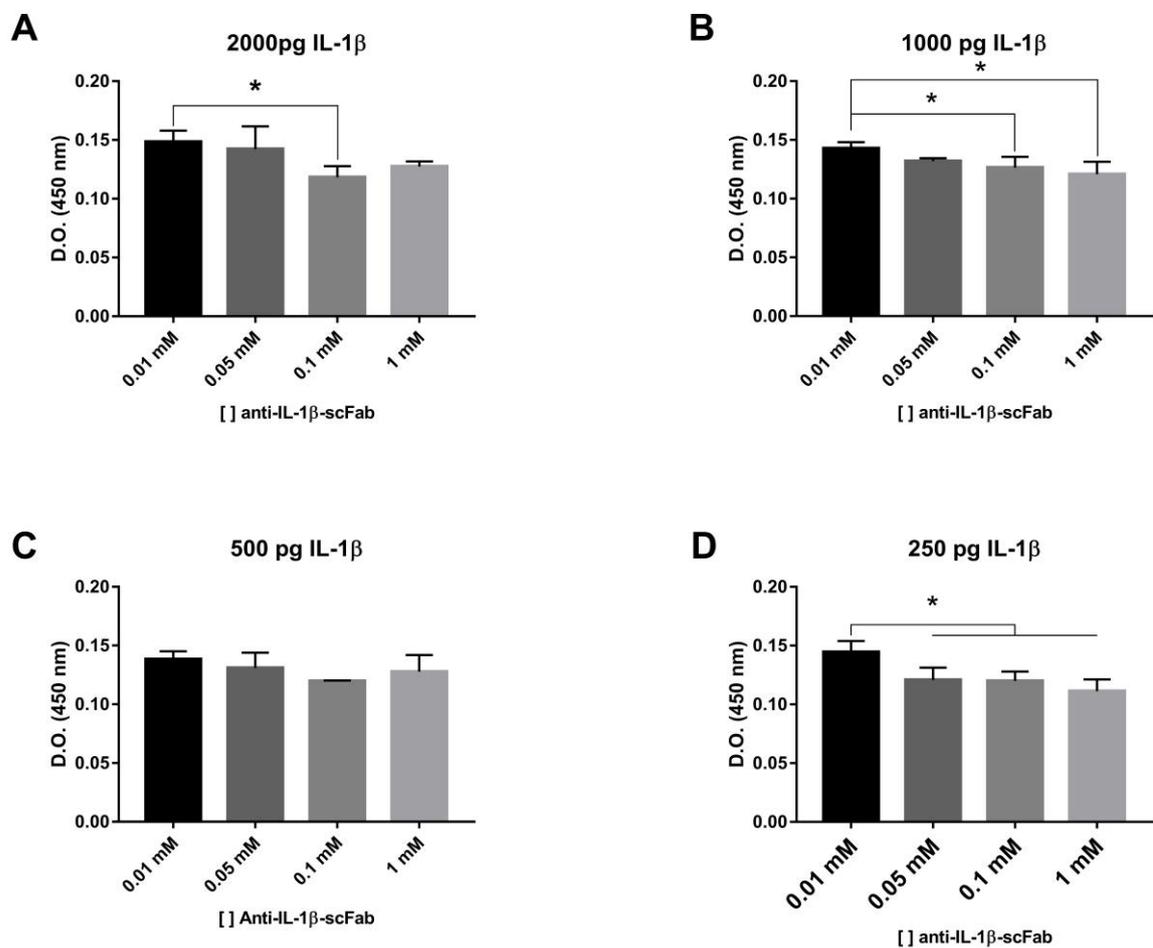


Figura 36: Ensaio de ELISA mostrando a ligação antígeno-anticorpo. Foram utilizadas diferentes concentrações do anti-IL-1 β -scFab (0,01, 0,1, 0,5 e 1 μ M) e quantidades diferentes de IL-1 β : (A) 2.000 pg, (B) 1.000 pg, (C) 500 pg e (D) 250 pg. * significa que há diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.5 DISCUSSÃO

Anticorpos recombinantes vêm sendo utilizados com sucesso na pesquisa, diagnóstico e terapia (QI et al., 2014; ELGUNDI et al., 2016). Avanços na engenharia genética permitiram que tanto anticorpos de cadeia completa como de somente a porção Fab ou Fv são utilizadas, sendo que a Fv geralmente é utilizada na forma de scFv, na qual uma cadeia peptídica é utilizada para ligar a porção variável das cadeias leve e pesada (QI et al., 2014). Até mesmo somente a parte variável da cadeia pesada é utilizada, a porção VHH do anticorpo, sendo conhecidos como nanobodies (MARCONI e ALVAREZ, 2014).

No tratamento da AR o uso de terapêuticos biológicos é eficiente, porém de alto custo (OLIVEIRA et al., 2015; BRATS, 2017). Em um estudo feito pela Universidade do Arizona, para avaliar os benefícios econômicos da produção de fármacos em plantas, estimou que a produção de vacinas, por exemplo, pode custar até 90% menos em países em desenvolvimento (FISCHER et al., 2013). O Canakinumab® cujo princípio ativo é um anticorpo de cadeia completa contra a citocina IL-1 β . Qi et al. (2012) desenvolveram um anticorpo no formato scFv anti-IL-1 β e este foi capaz de reconhecer a citocina *in vitro* e *in vivo*. Em 2014 Qi et al. Desenvolveram anticorpos no formato scFv e Fab contra IL-1 β . Após a imunização de camundongos com AR, o anti-IL-1 β -Fab mostrou-se mais eficiente na diminuição do que o anticorpo de cadeia completa e scFv. Hust et al. (2007) produziram um anticorpo no formato scFab utilizando como *linker* entre a cadeia leve a pesada o polipeptídeo derivado fago M13, e este foi mais eficiente que o formato Fab.

Os anticorpos no formato scFab são mais estáveis (HUST et al. 2007) e mostraram-se mais eficientes no reconhecimento do antígeno que o no formato Fab (KOERBER et al., 2015) bem como na diminuição dos sintomas da AR *in vivo* (QI et al., 2014), neste trabalho foi utilizado o anti-IL-1 β -scFab, utilizando o *linker* descrito por Hust et al. (2007). A partir da sequencia proteica predita a partir da sequencia gênica, por meio de modelagem computacional foi possível prever a estrutura tridimensional do anti-IL-1 β -scFab (Figura 31B), mostrando dobramento correto da proteína *in silico*.

No ensaio de ELISA o anticorpo produzido mostrou-se eficiente no reconhecimento da IL-1 β (Figura 36). Quando foi utilizada a menor quantidade de antígeno IL-1 β , houve maior ligação ao antígeno na menor concentração, 0,01 μ M, utilizada do anticorpo (Figura 36D). Nesta concentração seria necessária uma menor quantidade do anticorpo e também a 0,01 μ M o mesmo mostrou-se menos tóxico em teste de viabilidade celular *in vitro* (Qi et al., 2014).

O reconhecimento do antígeno no ELISA mostra que, segundo Qi et al., (2012), também que houve dobramento correto do anticorpo corroborando o modelo tridimensional gerado pelo Modeller9v19. O dobramento da cadeia proteica é essencial para o funcionamento da proteína. A produção de proteínas recombinantes é mais complexa devido à necessidade dessas modificações pós-traducionais. A produção em bactérias tem baixo custo, mas não faz modificações pós-traducionais (ELGUNDI et al., 2016). O uso de células de mamíferos é uma alternativa, pois as modificações pós-traducionais são feitas, mas há a desvantagem do alto custo e crescimento celular mais lento que as bactérias (DIETMAIR et al., 2012). O Canakinumab® é produzido em células CHO e Qi et al. (2014) produziram os formatos anti-IL-1 β -scFv e anti-IL-1 β -scFab em *E. coli*.

Neste trabalho o anti-IL-1 β -scFab foi expresso com sucesso na planta *N. benthamiana*. Segundo dados disponíveis na literatura, a produção em plantas diminui o custo, o risco de contaminação por patógenos e as plantas tem capacidade de fazer modificações pós-traducionais, além de ser possível escalonar o processo, para aumentar a produção (NANDI e KHUSH, 2015; FISCHER et al., 2015; BUYEL et al., 2017). Diversos grupos produziram anticorpos em plantas com sucesso (DONG et al., 2017; JULVE PARREÑO et al., 2017) e recentemente nosso grupo produziu o anti-Bap1-scFv, contra toxina do veneno de *Bothrops asper*, em *N. benthamiana*, e mostrou que o anticorpo foi capaz de reconhecer e inibir a toxina do veneno.

As plantas possuem mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT) que leva à perda de função ou degradação do RNA alvo. Tais mecanismos protegem as plantas contra invasão de RNA viral e patógenos (ZAMORE, 2002). Transgenes inseridos em plantas podem ser silenciados por SGPT (VAUCHERET et al., 1998; JAUVION et al., 2016), diminuindo o rendimento da proteína de interesse. A proteína de revestimento do capsídeo viral do vírus

Turnip crinkle (TVC-CP) é capaz suprimir vias silenciamento gênico pós-transcricional em folhas agroinfiltradas de *N. benthamiana* (QU et al., 2003).

Neste trabalho foi feita a agroinfiltração com a *Agrobacterium* EHA101-TCV-CP juntamente com a bactéria com plasmídeo pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab. Apesar de não ter avaliado se o rendimento da agroinfiltração somente com pK7WG2D-anti-IL-1 β -scFab seria maior que o da co-agroinfiltração, já é relatado na literatura o uso da TCV-CP retarda os mecanismos de SGPT (QU et al., 2003; CHOI et al., 2004; BECHER et al., 2013).

5.6 CONCLUSÃO

Neste trabalho o anticorpo anti-IL-1 β -scFab expresso com sucesso em *N. benthamiana* e foi capaz de reconhecer o antígeno IL-1 β *in vitro*.

5.7 PERSPECTIVAS

- Avaliar, *in vitro*, a toxicidade celular dos anticorpos produzidos;
- Avaliar, *in vivo*, a eficácia do anticorpo anti-IL-1 β -scFab na diminuição da gravidade da artrite reumatóide em camundongos modelo;
- Produzir linhagens transgênicas de *N. benthamiana*, que expressem o anticorpo anti-IL-1 β -scFab.

5.8 REFERÊNCIAS

ANDREAKOS, E.; TAYLOR, P. C.; FELDMANN, M. Monoclonal antibodies in immune and inflammatory diseases. *Current opinion in biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 615-620, 2002.

ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J.; MACKENZIE, R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 24, n. 4, p. 501-519, 2005.

BATRA, S. K.; JAIN, M.; WITTEL, U. A.; CHAUHAN, S. C.; COLCHER, D. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Current opinion in biotechnology*, v. 13, n. 6, p. 603-608, 2002.

BECHER, M. L.; MARZOL, E.; MARCONI, P.; ALVAREZ, M. A. Expression of recombinant human prothrombin-2 in *Nicotiana tabacum*. VIII ENCUESTRO LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE BIOTECNOLOGÍA, 2013, Mar del Plata.

BIRD, R. E.; WALKER, B. W. Single chain antibody variable regions. *Trends in biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 132-137, 1991.

BRATS. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. Medicamentos Biológicos para o Tratamento da Artrite Reumatóide. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ce6dd08044ae53989625b66b0d9f14d3/Medicamentos+Biol%C3%B3gicos.pdf?MOD=AJPERES>. Acessado em 08/01/2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUYEL, J. F.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. Very-large-scale production of antibodies in plants: The biologization of manufacturing. *Biotechnology Advances*, v. 35, p. 458–465, 2017.

CAVALCANTI, F. S. Management of rheumatoid diseases: the Brazilian perspective. *Rheumatology*, v. 49, p. 2231–2232, 2010.

CHAN, H.T.; XIAO, Y.; WELDON, W.C.; OBERSTE, S.M.; CHUMAKOV, K; DANIELL, H. Cold chain and virus-free chloroplast-made booster vaccine to confer immunity against different poliovirus serotypes. *Plant Biotechnology Journal*, v. 14, n. 11, p. 2190-2200, 2016.

CHIKWAMBA, R. K.; MASON, H. S.; MAHONEY, R.; ARNTZEN, C. J. Transgenic plants: A new biopharmaceutical manufacturing platform. In *Proceedings of the 8th International Symposium on the biosafety of Genetically Modified Organisms*. 2004.

CHOI, C. W.; QU, F.; REN, T.; YE, X.; MORRIS, T. J. RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with

the Arabidopsis protein TIP. Journal of General Virology, v. 85, n. 11, p. 3415-3420, 2004.

CONITEC. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. (2016). Abatacepte para o tratamento da Artrite Reumatoide Moderada a Grave – 1ª linha de tratamento com biológicos após falha aos MMCDs sintéticos. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2016/Relatorio_Abatacepte_AR_aposfalhaMMCDsinteticos_final.pdf. Acessado em 06/12/2017.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Morbidade Hospitalar do SUS-por local de internação – Brasil. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>, acessado em 09/01/2016.

DIETMAIR, S.; NIELSEN, L. K.; TIMMINS, N. E. Mammalian cells as biopharmaceutical production hosts in the age of omics. Biotechnology Journal, v. 7, n. 1, p. 75-89, 2012.

DONG, Y.; LI, J.; YAO, N.; WANG, D.; LIU, X.; WANG, N.; JIANG, C. Seed-specific expression and analysis of recombinant anti-HER2 single-chain variable fragment (scFv-Fc) in *Arabidopsis thaliana*. Protein Expression and Purification, v. 133, p. 187-192, 2017.

ECKER, D. M.; JONES, S. D.; LEVINE, H. L. The therapeutic monoclonal antibody Market. mAbs, v. 7, n. 1, p. 9-14, 2015.

ELGUNDI, Z.; RESLAN, M.; CRUZ, E.; SIFNIOTIS, V.; KAYSER, V. The state-of-play and future of antibody therapeutics. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 122, p. 2-19, 2016.

FAHAD, S.; KHAN, F. A.; PANDUPUSPITASARI, N. S.; AHMED, M. M.; LIAO, Y. C.; WAHEED, M. T.; DARKSHAN, M.; HUSSAIN, S; JAN, A. Recent developments in therapeutic protein expression technologies in plants. Biotechnology Letters, v. 2, p. 265-279, 2015.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; WILLIAMS, R. O.; COPE, A. P.; GIBBONS, D. L.; KATSIKIS, P. D.; MAINI, R. N. Evaluation of the role of cytokines in autoimmune disease: the importance of TNF α in rheumatoid arthritis. Progress in Growth Factor Research, v. 4, n. 3, p. 247-255, 1992.

FISCHER, R.; SCHILLBERG, S.; F BUYEL, J.; M TWYMAN, R. Commercial aspects of pharmaceutical protein production in plants. Current Pharmaceutical Design, v. 19, n. 31, p. 5471-5477, 2013.

FISCHER, R.; VASILEV, N.; TWYMAN, R. M.; SCHILLBERG, S. High-value products from plants: the challenges of process optimization. Current Opinion in Biotechnology, v. 32, p. 156-162, 2015.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Microbial platform technology for recombinant antibody fragment production: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 31-42, 2017.

HU, C.C.; CHAW, J.R.; CHEN, C.F.; LIU, H.W. Controlled release bevacizumab in thermoresponsive hydrogel found to inhibit angiogenesis. *Bio-medical Materials and Engineering*, v. 6, p. 1941-1950, 2014.

HUST, M.; JOSTOCK, T.; MENZEL, C.; VOEDISCH, B.; MOHR, A.; BRENNEIS, M.; DÜBEL, S. Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC Biotechnology*, v. 7, n. 14, 2007.

JAUVION, V.; MALLORY, A. C.; VAUCHERET, H. Deciphering Post-transcriptional Gene Silencing Pathways Through Genetic Screens. *RNAi Technology*, 2016.

KAPLAN, J. A.; BARTHÉLÉMY, P.; GRINSTAFF, M. W. Self-assembled nanofiber hydrogels for mechanoresponsive therapeutic anti-TNF α antibody delivery. *Chemical Communications*, v. 52, n. 34, p. 5860-5863, 2016.

KAY, J.; CALABRESE, L. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology-Oxford*, v. 43, n. 3, p. iii2–iii9, 2004.

KOERBER, J. T.; HORNSBY, M. J.; WELLS, J. A. An improved single-chain Fab platform for efficient display and recombinant expression. *Journal of Molecular Biology*, v. 427, n. 2, p. 576-586, 2015.

JULVE PARREÑO, J. M.; HUET, E.; FERNÁNDEZ-DEL-CARMEN, A.; SEGURA, A.; VENTURI, M.; GANDÍA, A.; WIGDOROVITZ, A. A synthetic biology approach for consistent production of plant-made recombinant polyclonal antibodies against snake venom toxins. *Plant Biotechnology Journal*, 2017.

KOMAROVA, T. V.; BASCHIERI, S.; DONINI, M.; MARUSIC, C.; BENVENUTO, E.; DOROKHOV, Y. L. Transient expression systems for plant-derived biopharmaceuticals. *Expert Review of Vaccines*, v. 9, n. 8, p. 859-876, 2010.

LEUNG, S.; LIU, X.; FANG, L.; CHEN, X.; GUO, T.; ZHANG, J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 7, n. 3, p. 182-189, 2010.

LIANG, Y.; COFFIN, M. V.; MANCEVA, S. D.; CHICHESTER, J. A.; JONES, R. M.; KIICK, K. L. Controlled release of an anthrax toxin-neutralizing antibody from hydrolytically degradable polyethylene glycol hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 104, n. 1, p. 113-123, 2016.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MARCONI, P.; ALVAREZ, M. A. State of the art on plant-made single-domain antibodies. *Journal of Immunological Techniques in Infectious Diseases*, v. 3, n. 2, 2014.

MARQUES NETO, J.F.; GONÇALVES, E.T.; LANGEN, L.F.O.B.; CUNHA, M.F.L.; RADOMINSKI, S.; OLIVEIRA, S.M.; CURY, S. E.; MEDEIROS, F.; SAMPAIO, G. C. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatoide do adulto em amostras da população brasileira. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 33, n. 5, p. 169-73, 1993.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 389, n. 10086, p.2328-2337, 2017.

MELNIK, S.; NEUMANN, A. C.; KARONGO, R.; DIRNDORFER, S.; STÜBLER, M.; IBL, V.; STÖGER, E. Cloning and plant-based production of antibody MC10E7 for a lateral flow immunoassay to detect [4-arginine] microcystin in fresh water. *Plant Biotechnology Journal*, 2017.

MIRZAEI, M.; JALALI-JAVARAN, M.; MOIENI, A.; ZEINALI, S.; BEHDANI, M.; SHAMS-BAKHSH, M.; MODARRESI, M. Anti-VEGFR2 nanobody expression in lettuce using an infectious Turnip mosaic virus vector. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, p. 1-8, 2017.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MOTA, L. M. H.; CRUZ, B. A.; BRENOL, C. V.; PEREIRA, I. A.; REZENDE-FRONZA, L. S.; BERTOLO, M. B.; LIMA, R. A. C. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide, *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, n. 2, p.135-174, 2012.

NANDI, S.; KHUSH, G. S. Strategies to Increase Heterologous Protein Expression in Rice Grains. *Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants*. Springer New York, p. 241-262, 2015.

NEUBERGER, M. S.; WILLIAMS, G. T.; FOX, R. O. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*, v. 312, n. 5995, p. 604-608, 1983.

OLINGER, G. G.; PETTITT, J.; KIM, D.; WORKING, C.; BOHOROV, O.; BRATCHER, B.; PAULY, M. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 44, p. 18030-18035, 2012.

OLIVEIRA, A. V. D. análise dos gastos do ministério da saúde com medicamentos para tratamento da artrite reumatoide no brasil no período 2010 a 2014. 2015. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Saúde Coletiva). Universidade de Brasília, Brasília.

POGUE, G. P.; VOJDANI, F.; PALMER, K. E.; HIATT, E.; HUME, S.; PHELPS, J., VELASCO, J. Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant-based transient expression systems. *Plant Biotechnology Journal*, v.8, n. 5, p. 638-654, 2010.

QI, J.; YE, X.; REN, G.; KAN, F.; ZHANG, Y.; GUO, M.; LI, D. Pharmacological efficacy of anti-IL-1 β scFv, Fab and full-length antibodies in treatment of rheumatoid arthritis. *Molecular Immunology*, v. 57, n. 2, p. 59-65, 2014.

QU, F.; REN, T.; MORRIS, T. J. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *Journal of Virology*, v. 77, n. 1, p. 511-522, 2003.

RAZA, K.; FALCIANI, F.; CURNOW, S. J.; ROSS, E. J.; LEE, C. Y.; AKBAR, A. N.; SALMON, M. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Research & Therapy*, v. 7, n. 4, 2005.

SACK, M.; RADEMACHER, T.; SPIEGEL, H.; BOES, A.; HELLWIG, S.; DROSSARD, J.; FISCHER, R. From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnology Journal*, v. 13, n. 8, p. 1094-1105, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3^a ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 11, p. 656-664, 2012.

SLIWKOWSKI, M. X.; MELLMAN, I. Antibody therapeutics in cancer. *Science*, v. 341, n. 6151, p. 1192-1198, 2013.

STAGG, A. J.; BURKE, F.; HILL, S.; KNIGHT, S. C. Isolation of mouse spleen dendritic cells. *Dendritic Cell Protocols*, p. 9-22, 2001.

VASILEV, N.; SMALES, C. M.; SCHILLBERG, S.; FISCHER, R.; SCHIERMEYER, A. Developments in the production of mucosal antibodies in plants. *Biotechnology Advances*, v. 34, n. 2, p. 77-87, 2015.

VAUCHERET, H.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; VERNHETTES, S. Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, v. 6, n. 6, 1998.

WEAVER, A. L. The impact of new biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology-Oxford*, v. 43, n. 3, p. iii17, 2004.

WILKEN, L. R.; NIKOLOV, Z. L. Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 2, p. 419-433, 2012.

WORN, A.; PLUCKTHUN, A. Stability engineering of antibody singlechain Fv fragments. *Journal of Molecular Biology*, v.305, p. 989–1010, 2001.

ZHANG, B.; SHANMUGARAJ, B; DANIELL, H. Expression and functional evaluation of biopharmaceuticals made in plant chloroplasts. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 21, 17–23, 2017.

ZAMORE, P. D. Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, v. 296, n. 5571, p. 1265-1269, 2002.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi feita com sucesso a produção do anticorpo anti-IL-1 β -scFab. Além disso, foi estabelecido no Laboratório de Engenharia Genética de Plantas um protocolo para o desenvolvimento da estratégia de desenho do *cassete* de expressão de genes de interesse terapêutico, sua clonagem, expressão transiente, purificação e avaliação da funcionalidade *in vitro*. O próximo passo será determinar a funcionalidade do anticorpo *in vivo* e estabelecer uma linhagem transgênica de *N. benthamiana*, que produza de forma estável o anticorpo.

O desenvolvimento desta estratégia no laboratório permite que sejam produzidos diversos anticorpos, abrindo possibilidades para a produção a partir de outros medicamentos ou de qualquer anticorpo comercial cuja sequência de aminoácidos ou DNA esteja disponível.

Foram também desenvolvidos dois protocolos de produção de biomateriais do tipo hidrogel: um a partir de alginato e outro a partir de ECM óssea bovina. Além disso, a produção de nanobiocompósitos, combinando os dois tipos de hidrogel com NP TB. Ambos mostraram boa compatibilidade com MSCs e a adição de NP TB favoreceu a diferenciação osteogênica de MSCs *in vitro*. Será feita a avaliação do potencial nos nanobiocompósitos de induzir a formação óssea, *in vivo*.

Pretende-se ainda combinar o anticorpo produzido com os nanobiocompósitos e avaliar o potencial de auxiliar no tratamento da artrite reumatóide. Espera-se que a combinação auxilie no reparo da perda óssea nos pacientes com artrite reumatóide e diminua a necessidade de aplicações sucessivas de anti-IL-1 β , pois os hidrogéis tem potencial para liberar o anticorpo de forma prolongada no organismo.

Além disso, uma vez estabelecido o protocolo de produção dos biomateriais, pode-se agora fazer variações na concentração, podendo variar a viscosidade e a resposta celular e sua utilização para regeneração de tecidos diferentes. Por fim, é possível também a combinação dos hidrogéis com outras NPs, fatores de crescimento e fármacos.