

## **Proliferação, migração e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais expostas a um nanocompósito de hidroxiapatita e goma gelana dopada**

**Proliferation, migration, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells exposed to a nanocomposite of hydroxyapatite and doped gelan gum**

**Proliferación, migración y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales expuestas a un nanocompuesto de hidroxiapatita y goma gellan dopado**

Recebido: 27/11/2025 | Revisado: 09/12/2025 | Aceitado: 10/12/2025 | Publicado: 11/12/2025

**Joselma Aparecida de Oliveira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0900-2972>

Faculdade de Medicina - FAMEJIPA, Brasil

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: [josykades@gmail.com](mailto:josykades@gmail.com)

**Melissa Camassola**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2288-2131>

Universidade Luterana do Brasil, Brasil

E-mail: [camassola@gmail.com](mailto:camassola@gmail.com)

### **Resumo**

A perda precoce de tecidos requer pesquisas que busquem inovação para o tratamento e a aceleração do processo regenerativo. As lesões no tecido ósseo causam prejuízos sociais e econômicos significativos e são foco de estudos que visam aprimorar o processo de regeneração. As células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSCs) são candidatas promissoras para esse tipo de aplicação. Neste estudo, foi utilizado um novo biomaterial composto de hidroxiapatita e goma de gelana dopada com íons cério. Esse compósito apresenta estruturas semelhantes às da goma arábica, já utilizada em outros estudos, e proporciona vantagens relevantes e significativas para aplicação na osteogênese. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade do biomaterial e seus efeitos na proliferação, adesão, migração e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. A regeneração óssea completa depende da presença de agentes osteoindutores, como células ou biomoléculas. Diversos biomateriais têm sido desenvolvidos e aplicados em modelos animais para acelerar esse processo, incluindo cimentos de fosfato de cálcio e biopolímeros. Um dos grandes avanços nesta área é o uso de biomateriais como suporte para integração, manutenção e diferenciação celular. As células que compõem os tecidos e órgãos estão inseridas em uma complexa rede molecular denominada matriz extracelular (ECM), cujas moléculas promovem vias de sinalização que direcionam o crescimento e a diferenciação celular.

**Palavras-chave:** Células-tronco; Engenharia de tecidos; Terapia celular; Osteogênese.

### **Abstract**

Early tissue loss requires research aimed at developing innovative approaches for treatment and accelerating the regenerative process. Bone tissue injuries cause significant social and economic impacts and are the focus of studies seeking to improve regeneration. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) are promising candidates for this type of application. In this study, a novel biomaterial composed of hydroxyapatite and gellan gum doped with cerium ions was used. This composite exhibits structural similarities to gum arabic, previously employed in other studies, and provides relevant and significant advantages for application in osteogenesis. The aim of this work was to evaluate the cytotoxicity of the biomaterial and its effects on the proliferation, adhesion, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Complete bone regeneration depends on the presence of osteoinductive agents such as cells or biomolecules. Several biomaterials have been developed and applied in animal models to accelerate this process, including calcium phosphate cements and biopolymers. One of the major advances in this field is the use of biomaterials as scaffolds for cell integration, maintenance, and differentiation. The cells that constitute tissues and organs are embedded in a complex molecular network known as the extracellular matrix (ECM), whose molecules promote signaling pathways that direct cell growth and differentiation.

**Keywords:** Stem cells; Tissue engineering; Cell therapy; Osteogenesis.

### **Resumen**

La pérdida temprana de tejidos requiere investigaciones que busquen innovaciones para el tratamiento y la aceleración del proceso regenerativo. Las lesiones del tejido óseo provocan perjuicios sociales y económicos significativos y

constituyen el foco de estudios dirigidos a mejorar el proceso de regeneración. Las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (BMSCs) son candidatas prometedoras para este tipo de aplicación. En este estudio se utilizó un nuevo biomaterial compuesto por hidroxiapatita y goma gellan dopada con iones de cerio. Este compuesto presenta estructuras similares a las de la goma arábica, utilizada previamente en otros estudios, y ofrece ventajas relevantes y significativas para su aplicación en la osteogénesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad del biomaterial y sus efectos sobre la proliferación, adhesión, migración y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. La regeneración ósea completa depende de la presencia de agentes osteoinductores, como células o biomoléculas. Se han desarrollado y aplicado diversos biomateriales en modelos animales para acelerar este proceso, incluidos los cementos de fosfato de calcio y los biopolímeros. Uno de los grandes avances en este campo es el uso de biomateriales como soporte para la integración, el mantenimiento y la diferenciación celular. Las células que componen los tejidos y órganos están inmersas en una compleja red molecular denominada matriz extracelular (ECM), cuyas moléculas promueven vías de señalización que dirigen el crecimiento y la diferenciación celular.

**Palabras clave:** Células madre; Ingeniería de tejidos; Terapia celular; Osteogénesis.

## 1. Introdução

### 1.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo constitui-se de uma matriz extracelular mineralizada e populações celulares especializadas. Sua matriz extracelular é predominantemente formada por colágeno tipo I (90%), complementado por proteínas não colagenosas (10%), incluindo osteocalcina (OC), osteonectina (ON), sialoproteínas ósseas e proteoglicanos, que modulam a mineralização, maturação matrical e regulação da atividade osteocítica (Portinho; Boin & Bertolini, 2008).

Trata-se de um tecido conjuntivo especializado, dinâmico e submetido a remodelação contínua, desempenhando funções mecânicas (suporte a partes moles e músculos, proteção orgânica), metabólicas (reservatório iônico) e hematopoéticas (produção de elementos sanguíneos). Suas unidades funcionais básicas compreendem osteoblastos (formadores ósseos), osteoclastos (reabsorvedores) e células precursoras/associadas (endoteliais, neurais), organizados em unidades multicelulares ósseas (Frost, 2001). Lesões teciduais ósseas geram impactos sociais e econômicos globais expressivos, impulsionando pesquisas inovadoras em regeneração tecidual nas últimas décadas. A engenharia de tecidos emerge como estratégia terapêutica promissora, explorando mecanismos autorreparadores limitados em cenários de lesões extensas ou comorbidades (osteoporose, infecções, diabetes, tabagismo) (Lee et al., 2010) (Fisher; Peretti; Scotti, 2016). A regeneração óssea plena requer osteoindutores exógenos, como células ou biomoléculas (Assis-Ribas et al., 2018).

### 1.2 Medicina regenerativa e engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos representa paradigma biomédico contemporâneo, potencializando a cicatrização endógena para restaurar tecidos lesados via ampliação, substituição ou reconstrução tecidual. Integra transplantes celulares e biomateriais biocompatíveis (inerte ou bioativos) como indutores regenerativos (Park et al., 2013). Avanços notáveis incluem scaffolds biomateriais que mimetizam a matriz extracelular (ECM), rede molecular complexa que orquestra sinalização, adesão e diferenciação celular, além de prover suporte arquitetural tridimensional (Pires; Bierhalz & Moraes, 2015).

### 1.3 Biomateriais

Décadas de 1980 demarcam transição paradigmática: de biomateriais inóspitos para substituição anatômica a formulações biodegradáveis otimizadas. Classificação atual abrange metais, cerâmicas, polímeros e compósitos, com ênfase em scaffolds porosos nano/microestruturados que modulam morfologia, alinhamento e fate celular via topografia superficial, área específica e interconectividade poral (Zheng et al., 2013; Matlock-Colangelo & Baeumner, 2012). Aplicações pré-clínicas aceleram regeneração óssea com cimentos fosfocálcicos e biopolímeros (Khor & Lim, 2003). Compostos inovadores incorporam hidroxiapatita a heteropolissacarídeos como goma de cajueiro (*Anacardium occidentale*; galactose, arabinose, ramnose, glicose, ácido glicurônico), estruturalmente análoga à goma arábica, porém superior em pureza proteica, fibrilar e

reológica (Quelemes et al., 2017; Hadavi et al., 2017; Kumar et al., 2012). Sua abundância nordestina brasileira reforça viabilidade na engenharia osteal.

#### **1.4 Células na engenharia tecidual**

Fontes celulares diversificadas (fibroblastos, hepatócitos, queratinócitos) desafiam cultivo: queratinócitos demandam feeder layers e manipulação delicada, mitigada por associações com biomateriais/fibroblastos (Chandrasekaran et al., 2011). Células-tronco supremam linhagens diferenciadas na tríade engenharia tecidual (células, scaffolds, fatores), por pluripotência, secreção paracrína, imunomodulação e vetoração gênica.

#### **1.5 Células-tronco**

Definidas por autorrenovação prolongada e geração de linhagens diferenciadas, distinguem-se embrionárias (ESCs, do massa celular interna blastocística; pluripotentes, formadoras de embrióides/teratomas) de adultas (fetal/adultas; reparo fisiológico/patológico via microambientes teciduais) (Kolios & Moodley, 2013; Nardi, 2005; Yamanaka, 2020). Isolamento mesenquimal adulto pioneirado nos anos 1960 (células estromais osteogênicas medulares; Friedenstein et al., 1974) elevou BMSCs como modelo ouro: mesodérmicas pluripotentes, provedoras de microssistemas regenerativos via homing vascular, limitação lesional e mediação paracrína (Nardi & Meirelles, 2006). Perfil funcional: autorrenovação/multipotência; quimiotaxia/inflamação; trofismo/imunomodulação/angiogênese; diferenciação direta em osso/cartilagem vs. paracrinia em cardíaco/vascular (Ciapetti; Granchi & Baldini, 2012). BMSCs supremam progenitores umbilical/adiposos em pluripotência, imunogenicidade baixa e proliferação robusta para regeneração osteal.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade do biomaterial e seus efeitos na proliferação, adesão, migração e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea.

### **2. Metodologia**

Realizou-se uma pesquisa experimental, laboratorial de natureza qualitativa e quantitativa (Pereira et al., 2018) com uso de estatística descritiva simples com uso de valores de média e desvio padrão (Shitsuka et al., 2014) e com uso de análise estatística (Vieira, 2021).

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram da Sigma-Aldrich Co LLC, a não ser quando indicada outra marca. Os plásticos foram BD Falcon (São Paulo, Brasil). O meio de cultura completo (culture complete medium - CCM) foi composto por Dulbecco Modified Eagle Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 10 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico (HEPES), 100 U de penicilina/mL e 10 mg de solução de estreptomicina/mL (Gibco BL, Grand Island, NY, USA). O meio osteogênico foi constituído de CCM suplementado com 10-8 M de dexametasona, 5 µg ácido ascórbico 2-fosfato mL-1, e 10 mM de fosfato de β-glicerol; este meio foi denominado CCM-O (culture complete medium - osteo). Solução salina balanceada de Hank sem íons de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foi utilizada para lavar os tecidos e células. Todos os experimentos com células-tronco mesenquimais foram com as células entre passagens 3 e 6 e em triplicata.

#### **2.1 Animais**

Este estudo utilizou ratos machos de espécie/linhagem Wistar Kyoto (n=5) com 60 dias de idade, produzidos e disponibilizados pelo Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC), conforme aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (nº 5472/17). Os animais foram sacrificados com uma overdose de Ketamina e Xilazina. Imediatamente após, foi realizada a coleta do material da medula óssea.

## 2.2 Biomaterial

O biomaterial aplicado neste estudo é um nanocompósito de hidroxiapatita, desenvolvido e fornecido pelo Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCELT) da Universidade Federal do Piauí.

O biomaterial foi elaborado como detalhado a seguir:

- síntese da hidroxiapatita (Hap) dopada - A síntese dos diferentes fosfatos de cálcio ocorreu através do método de precipitação simples, onde se utilizou precursores para ocorrer a síntese dos fosfatos de cálcio. O hidróxido de cálcio utilizado como agente precursor dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o fosfato de amônio dibásico foi utilizado como agente precursor do agrupamento iônico  $\text{PO}_4^{3-}$ . Estes foram dissolvidos em água, separadamente, e posteriormente foram misturados e colocados em um bêquer. Já no bêquer, ocorreu uma agitação magnética por um intervalo de tempo de aproximadamente 4 horas. Após este período de agitação, este foi levado à estufa por um período de 4 horas, com a temperatura permanecendo com um valor de aproximadamente 110°C. Após a secagem, o material foi lavado e centrifugado, desprezando-se o sobrenadante. Este procedimento de lavagem foi repetido por três vezes. Após a lavagem, o fosfato de cálcio sintetizado é colocado em uma placa de petri e envolto por papel alumínio, existindo-se alguns furos no papel, e levado novamente à estufa, deixado secar por 24 horas. Após essa nova secagem, o material foi macerado em um almofariz de porcelana e pistilo, dando origem ao pó da hidroxiapatita. Após o pó ser adquirido, este foi imerso em solução contendo íons de  $\text{Ce}^{3+}$ , passando por agitação magnética por 24 horas ininterruptas, para que ocorresse a dopagem por troca iônica. O pó de HAp dopado com íons de cério foi seco, obtendo-se o pó de HAp dopado com  $\text{Ce}^{3+}$  (HapCe). Obtenção dos biocompósitos - a obtenção dos compósitos de HAp dopada com os íons  $\text{Ce}^{3+}$ , também é acrescido uma pequena quantidade de goma gelana (Gel) para preparo dos scaffolds. Os biomateriais testados foram denominados como: HapGel (hidroxiapatita e goma gelana) e HapCeGel (hidroxiapatita dopada com íons cério e goma gelana).

## 2.3 Preparação Extrato do Biomaterial

Com intuito de verificar se o biomaterial libera algum composto que tóxico para as células, este foi inicialmente incubado em contato com meio completo, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) com 10% de Soro Fetal Bovino e penicilina/estreptomicina, a 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Após esse período o extrato foi usado para o ensaio de citotoxicidade.

## 2.4 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado baseado na norma ISO 10993-6: 2009 (Iso, 2009). Concomitante, células da linha L929 foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, o extrato foi centrifugado, colocado em contato 100  $\mu\text{L}$  com as células da linhagem L929 e incubado por mais 24, 48 e 72 horas. Em seguida, a viabilidade celular foi avaliada pelo o teste colorimétrico do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide].

## 2.5 Isolamento das células

As BMSC foram isoladas a partir do fêmur dos ratos de acordo com procedimento descrito por Meirelles e Nardi (2003). Após o corte de ambas as extremidades do fêmur, a medula óssea foi lavada com 1 mL de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) com 10% de Soro Fetal Bovino e cultivadas em 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado 72 h após o isolamento para remover as células não aderentes. Após o isolamento, as células-tronco mesenquimais foram cultivadas em CCM com soro fetal bovino e 100 UI/mL Penicilina /100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  Estreptomicina. Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as culturas foram repicadas. Todos os experimentos foram feitos em triplicata. A

morfologia das culturas foi analisada por visualizações periódicas em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemanha). Fotomicrografias foram feitas com câmera digital (AxioCam MRC, Zeiss), utilizando AxioVision software 3.1 (Zeiss).

## 2.6 Proliferação celular

Foi avaliado a taxa de proliferação celular após 72 horas de cultivo. A avaliação da proliferação e viabilidade celular foi realizada usando o ensaio de MTT).

As BMSCs foram semeadas numa placa de 96 poços ( $10^4$  células / poço; o volume médio: 100  $\mu$ L) e incubadas durante 24 h e 48 h com CCM contendo o extrato. Durante as últimas 2 horas de incubação, o meio foi removido e 50  $\mu$ L de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5- difeniltetrazolio) foi adicionado (1 mg/mL). Os sais de formazan foram diluídos em 100  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro (Multiskan Ex original, Serial RS-232c) a 540 nm. CCM como controle negativo. Os dados de atividade metabólica foram expressos em percentagem em relação ao controle negativo (CCM).

## 2.7 Análise de diferenciação osteogênica

Para verificar o potencial do biomaterial na indução a osteogênese, as BMSCs foram colocadas em contato com HDMEM suplementado com extrato do biomaterial e um grupo apenas com HDMEM por durante 21 dias. O meio foi trocado a cada três dias.

## 2.8 Avaliação da diferenciação e análise de mineralização

Para a observação da diferenciação, após o período de indução, o constructo biomaterial/células foi lavado com tampão fosfato (PBS) e fixado com paraformaldeído (4%) durante 20 minutos. O fixador foi retirado e adicionada Alizarin Red S durante 05 minutos para coloração da matriz resultante de cálcio. O corante foi removido e lavado com água deionizada. A placa de cultivo visualizada em microscópio de contraste de fase.

Após a coloração com a Alizarina e a observação da produção de cálcio, as células foram incubadas com 500  $\mu$ L de DMSO, durante 5 min. Subsequentemente, as amostras foram distribuídas numa placa de 96 poços para a leitura espectrofotométrica (Multiskan Ex original, serial RS-232C) a 540 nm. E a análise semi-quantitativa foi realizada com base em uma curva de Alizarina.

## 2.9 Teste de Migração

Foi utilizado uma placa de 12 poços, em cada poço continha 100.000 células, O teste foi realizado com 3 poços com extrato de HapGel e 3 poços com HapCeGel e foram usados como controles células em CCM e CCM-O. Após a preparação dos meios, foi feita a lesão na placa, um risco firme e conciso, após a lesão foi lavado por duas vezes com Hank's ( 1ml) em cada lavagem, foi acrescentado 3 ml de cada meio em cada poço com as células aderidas e já lesionadas, foi fotografado em 0, 24, 48 e 72 horas.

## 3. Resultados e Discussão

A busca por alternativas eficientes e regenerativas de osso minimamente invasivas, seguras e de qualidade tem sido cada vez maior, novos biomateriais vêm sendo testados em pesquisas em diversos centros de engenharia de tecido em diferentes lugares no mundo. Para desenvolver estes substitutos biológicos a engenharia de tecido ósseo se baseia em três princípios: células-tronco, biomaterias com capacidade osteocondutivas e fatores de crescimento que induzem a formação

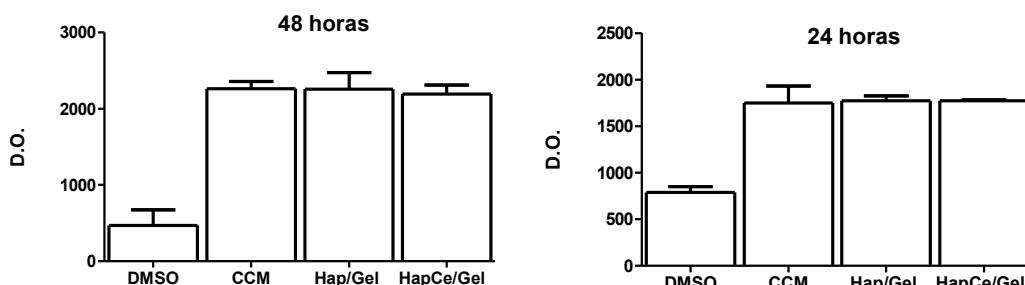
óssea (Langer; Vacanti, 1993). A associação de células-tronco mesenquimais e biomateriais indutores de osteogênese é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea. A associação de células-tronco mesenquimais e biomateriais indutores de osteogênese é um dos grandes desafios da engenharia tecidual óssea. Cada um destes elementos, quando utilizados sozinhos, são capazes de promover a regeneração do osso, entretanto, quando utilizados em combinações ou todos ao mesmo tempo o resultado é melhor. (Verwer; Eberli; Weger, 2011). Uma variedade de biomateriais tem sido desenvolvida, esses biomateriais contém propriedades morfológicas adequadas quanto à arquitetura dos poros, tamanho e interconectividade. As aplicações de biomateriais na biologia celular têm demonstrado que os aspectos estruturais podem influenciar a função da célula, seu destino e a formação do tecido.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um novo biomaterial contendo hidroxiapatita, hidroxiapatita dopada com íons de  $\text{Ce}_3^+$  e goma gelana (Hap/Gel e HapCe/Gel). Hap/Gel e HapCe/Gel são de fácil acesso e baixo custo para a aplicação na reparação tecidual. A expectativa é que esses novos biomateriais, possam ter capacidade osteocondutora e osteoindutora devido a sua composição. Para tanto, inicialmente testamos o efeito de extrato obtido a partir dos biomateriais na viabilidade celular de L929 para identificar algum possível efeito na citotoxicidade. Posteriormente, células-tronco derivadas de medula óssea (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell – BMSCs) foram expostas ao extrato com o intuito de avaliar o efeito na proliferação celular. Para quantificar o papel do biomaterial na diferenciação osteogênica as BMSCs foram incubadas por 14 dias com meio contendo os extratos. Os níveis de mineralização foram quantificados com a coloração de alizarina.

### 3.1 Citotoxicidade

Inicialmente foi realizado o teste de citotoxicidade MTT, com células de linhagem L929 com o intuito de verificar se os biomateriais Hap/Gel e HapCe/Gel liberavam algum composto da sua estrutura ou do procedimento de elaboração das peças. Os extratos obtidos a partir dos biomateriais foram adicionados aos meios de cultura e as células ficaram em contato por 24 e 48h. A Figura 1 apresenta os níveis de viabilidade celular, foi usado DMSO como um controle do experimento por induz morte celular, as células expostas a CCM foram consideradas como 100 % de viabilidade (D.O.:  $1748 \pm 368$  com 24h e D.O.:  $2263 \pm 209$  com 48h) por terem sido cultivadas com o meio padrão para esse tipo celular. Como pode-se observar nas imagens os níveis de viabilidade nas células que ficaram em contato com os biomateriais foram equivalentes às células nas condições CCM tanto em 24 (Hap/Gel:  $1771 \pm 112$  e HapCe/Gel:  $1773 \pm 19$ ) como em 48h (Hap/Gel:  $2258 \pm 487$  e HapCe/Gel:  $2191 \pm 265$ ) de incubação. Após 48h de incubação foi observado um aumento na viabilidade celular em todos os grupos em comparação ao período de 24h, indicando que todas as células expostas ao biomaterial foram capazes de manter seu potencial proliferativo. Portanto, os biomateriais não apresentaram toxicidade e seguiram sendo empregados em ensaios para avaliar o seu efeito em BMSCs.

**Figura 1** - Teste de viabilidade celular após 24h e 48h em contato com extrato dos biomateriais Hap/Gel e HapCe/Gel.



Os dados foram representados em média ± desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

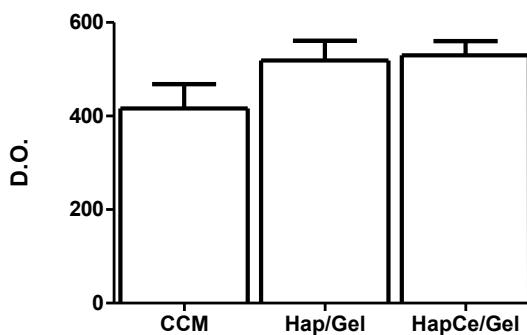
Frequentemente novos biomateriais são desenvolvidos para uso na recuperação óssea, o ideal é que cada nova formulação seja investigada quanto ao seu potencial citotóxico, seguindo as normas ISO 10993-6: 2009 (Iso, 2009). O ensaio indicado pela norma é um teste usando o método de MTT em uma linhagem celular denominada L929.

As L929 são células fibroblásticas de origem murina, possuem *doubling population time* curto fazendo com que sejam mais sensíveis aos compostos testados. Alguns trabalhos como de Filho et al. (2018) usam como ensaio para avaliar a citotoxicidade do biomaterial, um composto de polisacárido sulfatado (SP), o teste de MTT em células derivadas de geleia de Warthon que ficaram em contato com SP e não identificaram níveis de citotoxicidade significativo. Neste ano de 2019 os mesmos autores que desenvolveram os biomateriais analisados nesta dissertação publicaram a caracterização de biomateriais semelhantes, compostos por hidroxiapatita, goma de cajueiro e íons cério. O ensaio para avaliar citotoxicidade também foi feito usando células-tronco, e teve como fonte medula óssea de coelho, o biomaterial ficou em contato com as células por 24 horas e não apresentou toxicidade (Santos et al., 2019). Entretanto os biomateriais precisam ser testados quanto a sua citotoxicidade da mesma forma (que analisamos os biomateriais Hap/Gel e HapCe/Gel, já que as células-tronco mesenquimais possuem matriz extracelular densa e taxa de doubling population time entre 40 a 50 horas (Markarian et al., 2014).

### 3.2 Efeito de Hap/Gel e HapCe/Gel em BMSCs Proliferação celular

Os níveis de proliferação celular foram avaliados mediante a capacidade de conversão do MTT em cristais de formazan, foi observado em todos as culturas-testes alta viabilidade (Figura 2). De forma geral as células foram capazes de proliferar em todas as condições de cultivo. A viabilidade celular foi usada como medida indireta de proliferação celular e os valores de D.O. obtidos não revelaram diferenças significativas entre os grupos (CCM:  $102,7 \pm 7,22$ ; CHA:  $103,57 \pm 8,8$ ; CCM-O:  $98,83 \pm 1,06$ ; CHA/CCM-O:  $107,33 \pm 6,31$ ).

**Figura 2** - Proliferação medida pela viabilidade celular. Conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina em CCM (controle), Hap/Gel (CCM contendo extrato de hidroxiapatita e goma gelana) e HapCe/Gel (CCM contendo extrato de hidroxiapatita, íons cério e goma gelana) por três dias.



Os dados foram representados em média ± desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

A expansão *in vitro* de células-tronco mesenquimais têm importante implicações para o desenvolvimento da pesquisa básica e estratégias terapêuticas tais como terapias celular e gênica usando modelos murinos (Meirelles; Nardi, 2003). Tal parâmetro se torna importante para ser avaliado também quando as células estão em contato com biomateriais, componentes

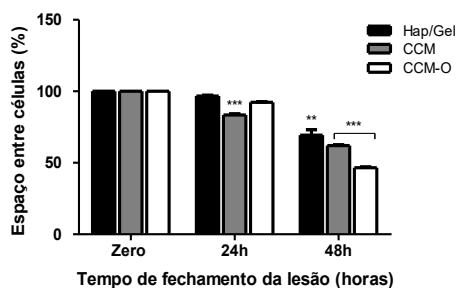
de biomateriais poderão diminuir ou aumentar o doubling population time, e para tratamento de lesões usando o construto biomaterial mais células espera-se que a capacidade de autorrenovação das células-tronco mesenquimais associadas não seja influenciada e sim intensificada a reparação do tecido que tenha sofrido algum tipo de lesão.

### 3.3 Migração

O efeito de Hap/Gel e HapCe/Gel na migração de BMSCs foi avaliado quantitativamente por análise da redução da área lesada na cultura pelo ensaio Scratch Wound Healing (SWH), teste que imita o processo de cicatrização de feridas. Após 24 horas, todos os grupos experimentais exibiram migração celular com uma diminuição da área aberta (Figura 3). As células que foram mantidas em meio CCM ( $83,39 \pm 1,19\%$ ) migraram mais rapidamente que as células que estavam em meio CCM contendo Hap/Gel ( $96,74 \pm 0,54\%$ ) e as em meio CCM-O ( $92,31 \pm 0,48\%$ ) com  $p < 0,001$ . No período de 48h pós-incubação em todas as condições as células continuaram migrando, entretanto as BMSCs expostas ao meio CCM com Hap/Gel ( $69,32 \pm 5,44\%$ ) diminuíram significativamente sua migração em comparação com as células em CCM ( $62,06 \pm 0,73\%$ ) e CCM-O ( $46,60 \pm 0,70\%$ ) com  $p < 0,01$ . A diferença entre os grupos CCM e CCM-O foi significativa com  $p < 0,001$  (Figura 4). De todas as condições testadas meio CCM-O foi o que mais induziu migração celular.

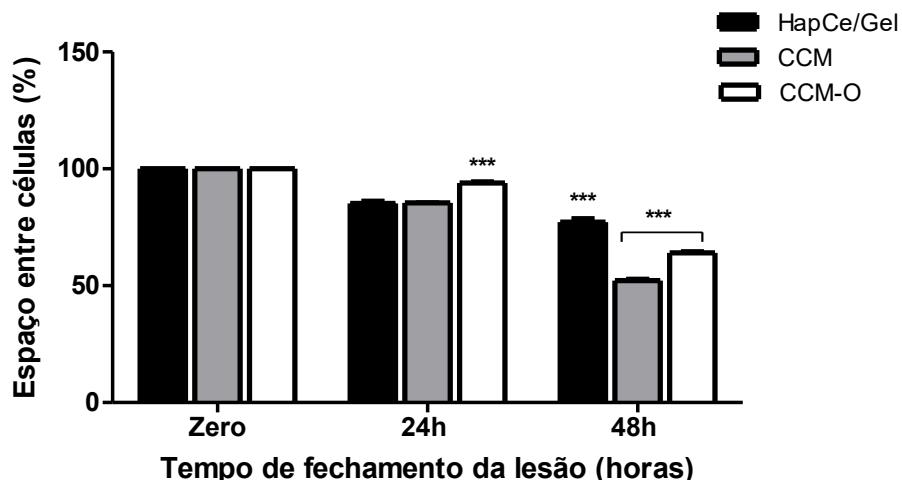
Quando as células permanecem nas suas condições padrões de cultivo, previamente estabelecidas, neste trabalho é em CCM, elas tendem a manter suas características primárias que é responder aos sinalizadores do meio, podendo migrar, manter-se indiferenciadas e autorrenovar-se (NGUYEN; TRAN; PHAM, 2019). No ensaio SWH observa-se que as células respondem a fatores que se encontram no meio podendo alterar as suas características padrão. As BMSCs murinas em processo de diferenciação osteogênica in vitro tendem a diminuir sua capacidade de migração para alterar sua morfologia e consequentemente iniciar a deposição de cálcio (Antonini et al., 2019). O efeito do meio CCM foi a diminuição significativa da área aberta na cultura com 24 h, mostrando assim que as células estão migrando, porém mais lentamente que o meio contendo o biomaterial e meio indutor. Antecipando os resultados das próximas imagens a aceleração da diferenciação osteogênica pelos biomateriais explica a diminuição de velocidade em fechar a área lesada no grupo contendo o biomaterial adicionado ao CCM.

**Figura 3** - Ensaio de migração celular das BMSCs expostas a diferentes condições de cultivo: CCM: meio padrão, CCM-O: meio indutor de osteogênese e Hap/Gel: CCM contendo extrato do biomaterial. As células foram mantidas em contato por 24 e 48h e área de entre as células foi mensurada.



Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Fonte: Autoria própria.

**Figura 4** - Ensaio de migração celular das BMSCs expostas a diferentes condições de cultivo: CCM: meio padrão, CCM-O: meio indutor de osteogênese e HapCe/Gel: CCM contendo extrato do biomaterial. As células foram mantidas em contato por 24 e 48h e área de entre as células foi mensurada.



Os dados foram representados em média  $\pm$  desvio padrão. \*\*\*p<0.001. Fonte: Autoria própria.

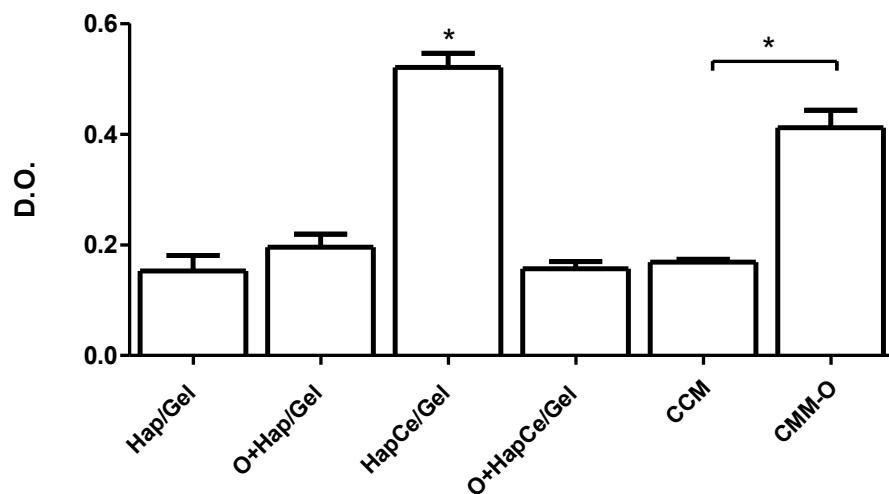
### 3.4 Indução Osteogênica

O efeito dos biomateriais no processo de osteogênese das BMSCs foi pesquisado através do contato das células com o meio contendo o extrato. As células ficaram incubadas durante 14 dias, passado este período a diferenciação osteogênica foi avaliada através do teste de coloração de alizarina, esse ensaio identifica e quantifica os níveis de deposição de cálcio. Na Figura 5 estão representados os níveis de depósito de cálcio na forma de densidade ótica (D.O.) lida após coloração e dissolução dos cristais de cálcio corados. O depósito de cálcio foi observado em todos os grupos de células, as células que ficaram em contato com o biomaterial HapCe/Gel (D.O.:  $0,520 \pm 0,04$ ) tiveram níveis de mineralização maior que as células que foram condicionadas nos outros meios Hap/Gel ( $0,153 \pm 0,061$ ), O+Hap/Gel ( $0,196 \pm 0,04$ ), CCM ( $0,168 \pm 0,007$ ) e CCM-O ( $0,411 \pm 0,045$ ) ( $p<0.001$ ). Um aumento significativo de mineralização das células que ficaram em contato com HapCe/Gel indicam íons cério estão potencializando a indução osteogênica.

A comparação entre as células que estiveram em meio padrão (CCM) e as que ficaram incubadas com o meio para indução osteogênica mostrou um aumento de aproximadamente 2,5 vezes, tal fenômeno era esperado já que este meio induz o processo (Antonini et al., 2019). No entanto o biomaterial HapCe/Gel foi capaz de induzir 1,3 vezes mais a mineralização que o próprio CCM-O, como as células em O+HapCe/Gel apresentaram níveis de mineralização equivalentes ao grupo CCM, sugerimos que o biomaterial atua isoladamente na diferenciação osteogênica.

Santos et al. (2019) que desenvolveram biomaterial contendo hidroxiapatita e cério já mostraram na sua caracterização que possuem características estruturais ótimas para aplicação em tratamentos ósseos, inclusive forma porosa tridimensional. Cerâmicas contendo íons cério foram testadas quanto associadas a uma linhagem de osteoblasto murina. A formulação mostrou não ser tóxica e suportar o cultivo das células (Ball et al., 2015).

**Figura 5** - Mineralização de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea quando em contato com diferentes meios durante 14 dias. CCM: meio padrão, CCM-O: meio indutor de osteogênese, Hap/Gel: CCM contendo extrato do biomaterial, O+Hap/Gel: CCM-O contendo extrato do biomaterial, HapCe/Gel: CCM contendo extrato do biomaterial, O+ HapCe/Gel: CCM-O contendo extrato do biomaterial.



Os dados foram representados em média ± desvio padrão. \*p<0.05. Fonte: Autoria própria.

A goma gelana também já foi descrita como indutora de osteogênese quando ligada a outras moléculas, como por exemplo, fosfato de cálcio e hidroxiapatita. Biomaterial composto de goma gelana induziu a osteogênese numa linhagem de pré-osteoblastos (MC3T3-E). A associação foi feita entre hidroxiapatita/goma gelana e as MC3T3-E, e como resultado os níveis de fosfatase alcalina aumentaram consideravelmente quando comparados com as células mantidas em meio osteogênico (Jamshidi et al., 2016). Os autores detectaram o aumento de fosfatase alcalina com 14 dias de exposição ao meio indutor e no mesmo trabalho não foi apresentado quantificação de alizarina. O pico de fosfatase acontece antes do processo de mineralização atingir a sua maior expressão, podendo assim os resultados de (Jamshidi et al., 2016), quanto à ALP, estarem predizendo os resultados de coloração com alizarina não avaliados pelos autores.

O efeito indutor encontrado em HapCe/Gel pode ser resultante, em parte, pela hidroxiapatita, entretanto as células que ficaram expostas ao Hap/Gel não tiveram aumento de osteogênese quando comparadas com o grupo CCM. Conhecidamente a hidroxiapatita em biomateriais apresenta indução da osteogênese. Schwarz et al., (2007) quando mostraram que hidroxiapatita bifásica+ betatricálcio-fosfato (Bone Ceramic) e também coberto com colágeno 21 (BioOss Collagen) guiaram a regeneração óssea. A hidroxiapatita já foi associada à quitosana na elaboração de biomaterial tridimensional e células-tronco de medula óssea humana tiveram alta taxa de indução osteogênica (Atak et al., 2017). No entanto, o baixo efeito indutor observado no nosso trabalho pode ser explicado pelo tempo de 14 dias de incubação, já que a mineralização tem sua apresentação máxima com 21 dias de incubação (Steward; Kelly, 2015).

Um estudo recente de (LU et al., 2018) também mostrou que o cério é capaz de induzir osteogênese. Os autores incorporaram óxido de cério em nanopartículas de BioGlass na elaboração de um biomaterial tridimensional. Diferentemente do que foi encontrado com o HapCe/Gel o biomaterial BioGlass induziu proliferação em células-tronco mesenquimais de medula óssea (BMSCs) humanas. E de acordo com os nossos resultados o BioGlass contendo cério também induziu osteogênese nas BMSCs humanas e in vivo em um modelo murino de lesão de calota craniana induziu formação óssea.

#### 4. Conclusão

As duas formulações do biomaterial não apresentaram perfil citotóxico com 24 e 48h de incubação. As BMSCs expostas ao biomaterial durante 72 horas não apresentaram atividade proliferativa aumentada ou reduzida em comparação às células que ficaram em contato com CCM. O efeito de Hap/Gel e HapCe/Gel na migração de BMSCs foi avaliado quantitativamente por análise da redução da área lesada na cultura pelo ensaio *Scratch Wound Healing* (SWH), e em 24h as células que foram mantidas em meio CCM ( $83,39 \pm 1,19\%$ ) migraram mais rapidamente que as células que estavam em meio CCM contendo Hap/Gel ( $96,74 \pm 0,54\%$ ) e em meio CCM-O ( $92,31 \pm 0,48\%$ ) com  $p < 0,001$ . No período de 48h pós-incubação em todas as condições as células continuaram migrando, porém as BMSCs expostas ao meio CCM com Hap/Gel ( $69,32 \pm 5,44\%$ ) diminuíram significativamente sua migração em comparação com as células em CCM ( $62,06 \pm 0,73\%$ ) e CCM-O ( $46,60 \pm 0,70\%$ ) com  $p < 0,01$ . A diferença entre os grupos CCM e CCM-O foi significativa com  $p < 0,001$ . De todas as condições testadas, o meio CCM-O foi o que mais induziu a migração celular. Na osteogênese o depósito de cálcio foi observado em todos os grupos de células, as células que ficaram em contato com o biomaterial HapCe/Gel (D.O.:  $0,520 \pm 0,04$ ) tiveram níveis de mineralização maior que as células que foram condicionadas nos outros meios Hap/Gel ( $0,153 \pm 0,061$ ), O+Hap/Gel ( $0,196 \pm 0,04$ ), CCM ( $0,168 \pm 0,007$ ) e CCM-O ( $0,411 \pm 0,045$ ) ( $p < 0,001$ ). Um aumento significativo de mineralização das células que ficaram em contato com HapCe/Gel indicam íons cério estão potencializando a indução osteogênica. A partir dos resultados encontrados no trabalho concluímos que o biomaterial composto de hidroxiapatita e goma gelana com a presença de íons cério na formulação não é citotóxico e ainda levou a um aumento significativo da indução de osteogênese. O biomaterial HapCe/Gel é um ótimo candidato para uso no tratamento de regeneração óssea podendo ser inclusive associado à células-tronco mesenquimais.

#### Referências

- Antonini, L. M., et al. (2019). Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on anodized niobium surface. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(9), 104.
- Assis-Ribas, T., et al. (2018). Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. *Developmental Biology*, 437(2), 63–74.
- Atak, B. H., et al. (2017). Preparation and characterization of amine functional nano-hydroxyapatite/chitosan bionanocomposite for bone tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 164, 200–213.
- Ball, J. P., et al. (2015). Biocompatibility evaluation of porous ceria foams for orthopedic tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(1), 8–15.
- Chandrasekaran, S., et al. (2011). Microenvironment induced spheroid to sheeting transition of immortalized human keratinocytes (HaCaT) cultured in microbubbles formed in polydimethylsiloxane. *Biomaterials*, 32(29), 7159–7168.
- Ciapetti, G., Granchi, D., & Baldini, N. (2012). The combined use of mesenchymal stromal cells and scaffolds for bone repair. *Current Pharmaceutical Design*, 18(13), 1796–1820.
- Fisher, J. N., Peretti, G. M., & Scotti, C. (2016). Stem cells for bone regeneration: From cell-based therapies to decellularised engineered extracellular matrices. *Stem Cells International*, 2016, 1–15.
- Frost, H. M. (2001). Why should many skeletal scientists and clinicians learn the Utah paradigm of skeletal physiology? *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2(2), 121–130.
- Hadavi, M., et al. (2017). Novel calcified gum Arabic porous nano-composite scaffold for bone tissue regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(4), 671–678.
- Jamshidi, P., et al. (2016). Modification of gellan gum with nanocrystalline hydroxyapatite facilitates cell expansion and spontaneous osteogenesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(7), 1568–1576.
- Kaneps, A. J., Stover, S. M., & Lane, N. E. (1997). Changes in canine cortical and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise. *Bone*, 21(5), 419–423.
- Khor, E., & Lim, L. Y. (2003a). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339–2349.
- Khor, E., & Lim, L. Y. (2003b). Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24(13), 2339–2349.
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10.

- Kumar, A., et al. (2012). Cashew gum: A versatile hydrophyllic polymer: A review. *Current Drug Therapy*, 7(1), 2–12.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926.
- Lee, S.-J., et al. (2010). Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*, 31(21), 5652–5659.
- Lu, X., et al. (2018). Influence of particle additions on corrosion and wear resistance of plasma electrolytic oxidation coatings on Mg alloy. *Surface and Coatings Technology*, 352, 1–14.
- Markarian, C. F., et al. (2014). Isolation of adipose-derived stem cells: A comparison among different methods. *Biotechnology Letters*, 36(4), 693–702.
- Matlock-Colangelo, L., & Baeumner, A. J. (2012). Recent progress in the design of nanofiber-based biosensing devices. *Lab on a Chip*, 12(15), 2612–2620.
- Meirelles, L. da S., & Nardi, N. B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology*, 123(4), 702–711.
- Nardi, N. B. (2005). All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools. *Medical Hypotheses*, 64(4), 811–817.
- Nguyen, A. T. M., Tran, H. L. B., & Pham, T. A. V. (2019). In vitro evaluation of proliferation and migration behaviour of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in presence of platelet-rich plasma. *International Journal of Dentistry*, 2019, 1–8.
- Park, J.-H., et al. (2013). Microcarriers designed for cell culture and tissue engineering of bone. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19(2), 172–190.
- Pereira, A. S., et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica [E-book]. Editora da UFSM.
- Pires, A. L. R., Bierhalz, A. C. K., & Moraes, Â. M. (2015). *Biomaterials: Types, applications, and market*. Química Nova.
- Portinho, D., Boin, V. G., & Bertolini, G. R. F. (2008). Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14(5), 408–411.
- Quelemes, P. V., et al. (2017). Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. *Carbohydrate Polymers*, 157, 567–575.
- Santos, V. B., et al. (2019). Development of composite scaffolds based on cerium doped-hydroxyapatite and natural gums—Biological and mechanical properties. *Materials*, 12(15), 2389.
- Shitsuka, R., et al. (2014). *Matemática fundamental para tecnologia* (2nd ed.). Editora Érica.
- Steward, A. J., & Kelly, D. J. (2015). Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Anatomy*, 227(6), 717–731.
- Verwer, K., Eberli, G. P., & Weger, R. J. (2011). Effect of pore structure on electrical resistivity in carbonates. *AAPG Bulletin*, 95(2), 175–190.
- Vieira, S. (2021). *Introdução à bioestatística*. GEN/Guanabara Koogan.
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy—Promise and challenges. *Cell Stem Cell*, 27(4), 523–531.
- Zheng, W., et al. (2013). High genome heterozygosity and endemic genetic recombination in the wheat stripe rust fungus. *Nature Communications*, 4(1), 2673.