

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC – UFABC
Programa de Iniciação Científica
Projeto de Pesquisa - Edital 04/2022

Título do projeto: Caracterização, preparo de amostras e análise comparativa de interação entre células e biomateriais.

Palavras-chave do projeto: Biomateriais. Preparo de amostras. Engenharia biomédica. Bioimageamento.

Área de conhecimento do projeto: Engenharia Biomédica

São Bernardo do Campo – SP

2022

SUMÁRIO

RESUMO	3
INTRODUÇÃO	4
OBJETIVOS	6
METODOLOGIA	7
CRONOGRAMA	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11

RESUMO

A engenharia biomédica é uma área multidisciplinar em que se objetiva a aplicação dos conhecimentos da engenharia nas áreas da saúde. Para isso, um dos enfoques é a criação de dispositivos biomédicos para fins diagnósticos, de monitorização e ou terapêuticos. Os biomateriais são um instrumento para a construção destes dispositivos, e a avaliação da performance deles, assim como seus efeitos em um sistema biológico, é um passo importante visando sua aplicação futura. Para tal avaliação, o preparo de amostras é uma etapa fundamental. Este trabalho pretende mostrar diversas formas de preparo de amostras visando a avaliação de biomateriais e de sua interação com células, por meio de diferentes técnicas de bioimageamento, assim como relatar seus resultados. Para isso, serão utilizadas variadas metodologias de ensaios de interação de células com biomateriais para o bioimageamento. Através dos diversificados resultados, ficará evidente a necessidade da importância de estudar essas interações, assim como a relevância da compreensão das relações células-biomateriais. Neste sentido, será possível avaliar quais formas de preparo de amostras e quais metodologias de processamento serão mais compatíveis e eficientes de acordo com a aplicação prática desejada. Para a análise dessas amostras serão utilizados os equipamentos de bioimageamento disponíveis na Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC (CEM-UFABC), através de variadas técnicas, tais como microscopia, tomografia, fluorescência, espectroscopia, entre outros. Os resultados deste trabalho irão contribuir para o entendimento do funcionamento dos equipamentos disponíveis pela CEM-UFABC, assim como para um melhor entendimento sobre métodos de preparação de amostras e sobre variadas técnicas de análises de amostras. Por consequência, levará a uma melhor compreensão das capacidades regenerativas dos biomateriais e suas aplicações tecnológicas na engenharia biomédica, aperfeiçoando, assim, suas funções e utilizações práticas.

INTRODUÇÃO

A engenharia biomédica é uma área que tem crescido nos últimos anos, e que objetiva integrar os conhecimentos das ciências exatas, especificamente engenharia, e aplicá-los no desenvolvimento e/ou aprimoramento de técnicas, insumos ou dispositivos voltados à saúde humana. Para tal, são necessários conceitos e princípios de pesquisa biomédica para fins diagnósticos e terapêuticos. A engenharia biomédica é uma área ampla com subáreas que incluem engenharia de tecidos, instrumentação biomédica, biomateriais, informática médica, óptica biomédica, imagens médicas, engenharia clínica, biomecânica, dentre outras. As aplicações da engenharia biomédica incluem o desenvolvimento de próteses e órteses biocompatíveis, diversos dispositivos médicos tais como equipamentos hospitalares, equipamentos de imagem, métodos de medicina regenerativa e órgãos artificiais, entre outros.¹

Os estudos com biomateriais são importantes para grande parte das aplicações da engenharia biomédica. Os biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos, e podem ter variados tipos de aplicações como sistemas de teranóstico, em vacinas, aplicações em materiais cirúrgicos etc, podendo ser de origem sintética ou natural, tanto na forma de sólidos, líquidos, géis ou pastas.² Essa tecnologia representa boa parte de produtos utilizados na área da saúde, sendo estimado o desenvolvimento e uso de cerca de 300 mil biomateriais em quase 2 décadas.³ Uma das primeiras definições de biomaterial foi dada pelo Dr. Jonathan Cohen em 1967, na qual o biomaterial pode ser interpretado como qualquer material utilizado para produzir um implante com um resultado razoavelmente positivo.⁴ Um material pode ser definido como biomaterial apenas se os benefícios obtidos com sua aplicação forem claramente superiores às suas desvantagens.⁸

As aplicações dos biomateriais têm como função melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes através de ferramentas biomédicas como: implantes (implantes dentários, placas, substitutos ósseos, malhas), sistema de liberação de medicamentos (implantes ou partículas), articulações artificiais, órgãos artificiais, lentes oculares e *stents* vasculares, entre outros.² Esses dispositivos podem substituir o tecido danificado, mimetizando as propriedades químicas e físicas do tecido natural, causando uma resposta mínima de corpo estranho, assim assumindo passivamente sua função.¹ Esses biomateriais são feitos a partir de uma série de processos de preparo de amostras, tais processos são de suma importância para a confiabilidade do biomaterial.

Para o desenvolvimento e futura aplicação clínica destes biomateriais, são necessários estudos rigorosos que visam sua caracterização, assim como sua

interação com os diferentes sistemas biológicos. A caracterização de um biomaterial pode ser efetuada de forma química, morfológica, óptica, mecânica, de estabilidade térmica etc. Para a avaliação biológica, um dos primeiros ensaios a ser efetuado, antes do estudo in vivo ou clínico, é o ensaio por cultivo celular, o qual visa estudar a interação das diferentes conformações dos biomateriais com diferentes células, de forma a estimar seu potencial uso.

Tendo em vista que os biomateriais podem auxiliar no potencial autorregenerativo do organismo, o que é efetuado na medicina regenerativa⁵, é necessário entender as interações que os biomateriais têm com os sistemas biológicos, já que esse conhecimento levará a uma melhor compreensão das capacidades regenerativas dos biomateriais auxiliando seu projeto com funcionalidades melhoradas (por exemplo, biocompatibilidade, bioatividade). As células Vero são bastante utilizadas para tal finalidade, já que é um tipo de linhagem celular que mimetiza ação de fibroblastos e já é bem definida e utilizada na comunidade científica como padrão de muitos experimentos científicos.⁷

Para que tais estudos ocorram, amostras destes biomateriais devem ser corretamente preparadas visando sua análise apropriada em um equipamento analítico específico. Essa etapa preliminar é um estágio importante de todo o processo de análise e ajuda na prevenção de contaminação da amostra, melhora a precisão da análise e diminui o risco de resultados imprecisos. Obter resultados corretos e informativos do procedimento analítico é o objetivo principal desta etapa.⁶

Para realizar essas análises, as diversas técnicas de bioimageamento são importantes. As microscopias de luz, eletrônicas, de fluorescência, espectroscopias, tomografias, entre outros, fornecem informações importantes e complementares entre si que permitem avaliar a interação biomaterial-tecido de forma completa. Contudo, as diferentes técnicas possuem especificidades que devem ser consideradas para análise, principalmente àquelas relacionadas ao preparo correto das amostras, evitando desperdício. Neste trabalho, pretende-se mostrar como a interação de um biomaterial com células pode ser avaliada de diferentes formas, assim como elucidar como as amostras devem ser preparadas para a correta avaliação pelos diferentes equipamentos de análise. Para tal, serão utilizados neste trabalho os diversos equipamentos de bioimageamento presentes na Central Experimental Multiusuário da Universidade Federal do ABC.

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a interação celular com biomateriais, através de diferentes técnicas de preparo de amostra e análises de bioimageamento.

Objetivos específicos:

1. Realizar diferentes técnicas de preparo de amostras para interação entre células Vero com biomateriais à base de esponja de gelatina.
2. Utilizar diversos equipamentos de análise de bioimageamento para avaliar a variação dos resultados obtidos nos ensaios.
3. Através dos resultados obtidos e avaliar quais técnicas de preparo de amostras são compatíveis com cada equipamento de bioimageamento e suas aplicações práticas.

METODOLOGIA

Amostras de Biomateriais

Para o desenvolvimento do projeto, serão utilizadas amostras de biomaterial à base de gelatina. Serão cultivadas, nestas membranas, células Vero, durante 7 dias, para verificação de interação celular com o biomaterial. Serão consideradas diferentes metodologias de processamento para a análise comparativa dos resultados.

Cultura de Células Vero

Nesse estudo, será realizado o cultivo da linhagem Vero, estabelecidas a partir de células do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) e apresentando morfologia tipo-fibroblastos (AMMERMAN et al., 2008)¹⁰. As células serão cultivadas em meio Ham F-10 (Sigma-Aldrich), contendo 10% de soro fetal bovino. A cultura será mantida a 37° C, com 5% de CO₂. As células serão cultivadas em inóculos com alta densidade celular, 1x10⁶ células/mL.

Microscopia de luz: contraste de fase

Durante todo o período experimental, até 7 dias de cultura, as células cultivadas sobre as amostras de biomateriais serão observadas por microscopia invertida, com contraste de fase (Axiovert A1, Zeiss).⁹

Microscopia de luz: campo claro

Após o período de cultura as células serão fixadas (glutaraldeído 2,5%) e coradas com cresil violeta, para análise citoquímica ao microscópio de luz invertido com campo claro.

Microscopia de fluorescência

Após o período de cultura, as células serão fixadas (glutaraldeído 2,5%) e serão preparadas para o suporte de lâminas, na qual serão incubados com o corante fluorescente DAPI por 5 minutos e lavadas com tampão fosfato salino (PBS). Essas

amostras serão analisadas no Microscópio de Fluorescência AXIO IMAGER A2, serão utilizados filtros de comprimento de onda de 358 nm para análise do fluoróforo.

Citoquímica: criostato e coloração

Após o período de cultura, as células serão fixadas (glutaraldeído 2,5%) e serão coradas com cresil violeta, posteriormente serão preparadas em parafina e fixadas no suporte do micrótomo criostático para realizar cortes histológicos na faixa entre 10 a 20 micrômetros.

Citoquímica: criostato e fluorescência

As amostras serão preparadas em parafina e fixadas no suporte do micrótomo criostático para o corte histológico de 10 a 20 micrômetros, posteriormente serão incubados com o corante fluorescente DAPI por 5 minutos e lavadas com tampão fosfato salino (PBS). Essas amostras terão uma análise citoquímica ao Microscópio de Fluorescência AXIO IMAGER A2, serão utilizados filtros de comprimento de onda de 358 nm para análise do fluoróforo.

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de biomateriais serão lavadas em tampão fosfato, fixadas com glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato (pH 7,4), durante 2 horas. Após a fixação será realizada a lavagem em água, durante 2 horas, e a desidratação em série de etanol, crescente (a partir de 30° até 100°). Para finalizar a desidratação as amostras serão submetidas ao ponto crítico (EM CPD300, Leica), e serão finalmente recobertas com 15 nm de ouro (Leica, EM ACE600), para observação ao microscópio de eletrônico de varredura (Quanta 250, FEI).¹¹

Análise por tomografia por coerência óptica (OCT)

Após cultivo celular, os biomateriais serão posicionados em placas de Petri, e avaliados em equipamento de OCT (Thorlabs, EUA), o qual possui um sistema de iluminação composto por SLED de 930 nm, resolução axial de 7 µm e lateral de 8 µm. O imageamento buscará visualizar a estrutura interna da esponja de colágeno, de forma a verificar as alterações promovidas pelo cultivo celular nesta estrutura. Para tal, em cada amostra serão efetuados dez escaneamentos com distância padronizada de

200 µm entre eles na região central das amostras e, nas imagens obtidas, será avaliada a presença de poros, tramas e outras estruturas internas. A quantificação destas estruturas será efetuada por coeficiente de atenuação óptica.

Um escaneamento tridimensional será também feito em cada amostra, de forma a se obter a imagem da mesma como um todo.]

Análise por Fotodocumentador

Após o período de cultura as células sobre amostras de biomateriais serão fixadas (glutaraldeído 2,5%) e serão preparadas, onde serão incubados com o corante DAPI e coloração com cresil violeta. Posteriormente as amostras serão inseridas no Fotodocumentador Bruker IN Vivo F Pro e serão utilizados filtros de variados comprimentos de onda para captação da fluorescência.

CRONOGRAMA

As atividades propostas para o desenvolvimento do projeto serão realizadas no período de 12 meses, conforme apresentado na tabela a seguir. As atividades estão apresentadas por trimestre, sendo previstas as entregas dos relatórios parcial e final, bem como a participação futura no Congresso de Iniciação Científica da UFABC de 2023.

Descrição das atividades	1º trimestre	2º trimestre	3º trimestre	4º trimestre
Revisão de literatura	X	X	X	X
Cultura de Células	X	X		
Citoquímica (Cortes histológicos, coloração)	X	X		
Análise em Microscopia de Luz (contraste de fase, campo claro e fluorescência)	X	X	X	
Análise em Microscopia Eletrônica		X	X	
Análise por OCT		X	X	
Análise por Fotodocumentação		X	X	
Análise e interpretação de dados			X	X
Relatório Parcial		X		
Relatório Final				X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang XY. Biomedical engineering for health research and development. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(2):220-4.
2. Pires ALR, Bierhalz ACK, Moraes AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. *Quim. Nova*. 2015; 38(7):957-971.
3. Soares GA. Biomateriais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). 2005. Disponível em: http://www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr10_biomateriais.pdf. Acesso em: 16/06/2022
4. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res A*. 2020 Aug 1;108(8):1617-1633.
5. Othman Z, Cillero Pastor B, van Rijt S, Habibovic P. Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials*. 2018 Jun;167:191-204.
6. Labmat Online. What is Sample Preparation?. Disponível em: <https://www.labmate-online.com/news/laboratory-products/3/breaking-news/what-is-sample-preparation/55540>. Acesso em: 15/06/22.
7. Kiesslich S, Kamen AA. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. *Biotechnol Adv*. 2020 Nov 15;44:107608.
8. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897-909.
9. Zeiss. Axio Vert.A1 for Biology. Disponível em: <https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/light-microscopes/axio-vert-a1-for-biology.html>. Acesso em: 20/06/22
10. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr Protoc Microbiol*. 2008 Nov;Appendix 4:Appendix 4E.
11. Thermo Fisher Scientific. Scanning Electron Microscopes. Disponível em: https://www.thermofisher.com/br/en/home/electron-microscopy/products/scanning-electron-microscopes.html?cid=2020-ms-beacon-products-sem&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=2020-ms-beacon-products-sem&gclid=CjwKCAjwCtCVBhA0EiwAT1fY7_dREOUSntBqGcAbFNRfo6-FQINOnlxrcwwWmlo0l_a0KJkve_L-RoClZgQAvD_BwE. Acesso em: 20/06/22.