



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**GABRIELA DE FÁTIMA SANTANA-MELO**

**EFETIVIDADE DE SCAFFOLDS DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-  
TEREFTALATO) / NANOHIPOXIAPATITA OBTIDOS POR  
ELETROFIAÇÃO PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA: avaliação *in vitro***

2016

**GABRIELA DE FÁTIMA SANTANA-MELO**

**EFETIVIDADE DE SCAFFOLDS DE POLI (BUTILENO ADIPATO-CO-  
TEREFTALATO) / NANOHIĐROXIAPATITA OBTIDOS POR ELETROFIAÇÃO  
PARA APLICAÇÃO BIOMÉDICA: avaliação *in vitro***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Santana-Melo, Gabriela de Fátima

Efetividade de scaffolds de poli (butileno adipato-co-  
tereftalato) / nanohidroxiapatita obtidos por eletrofiação para  
aplicação biomédica: avaliação in vitro. / Gabriela de Fátima Santana-  
Melo. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.  
71 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em  
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José  
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Anderson de Oliveira Lobo.

1. Eletrofiação. 2. PBAT. 3. Nanohidroxiapatita. 4. QRT-PCR. 5.  
Células MG63. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de, orient. II.  
Lobo, Anderson de Oliveira, coorient. III. Instituto de Ciência e  
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.  
IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V.  
UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,  
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer  
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 01 de fevereiro de 2016  
E-mail: gabrieladsantana@yahoo.com.br

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos** (Orientadora)

Instituto de Ciências e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Titular Carlos Alberto Alves Cairo**

Divisão de Materiais  
ITA – Instituto Tecnológico de Aeronáutica  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho**

Instituto de Ciências e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares**

Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento  
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba  
Campus de São José dos Campos

**Prof. Dr. Alexandre Luiz Souto Borges**

Instituto de Ciências e Tecnologia  
UNESP – Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 01 de fevereiro de 2016.

## DEDICATÓRIA

*À Deus, por ser o esteio maior da minha vida, ajudando-me a enfrentar todas as tarefas da minha existência, inclusive esta.*

*À minha mãe Nelza Campos, que me ensinou o valor dos estudos, responsabilidade e compromisso com tudo que nos propomos a realizar. Obrigada pelo carinho e dedicação, sem esse apoio e incentivo nada teria sentido. Não há palavras suficientes para agradecer por tudo de bom que fez e ainda faz por mim, minha eterna gratidão e amor.*

*Ao meu marido Daniel Melo, pelo carinho, paciência, dedicação e apoio incondicional. Tê-lo ao meu lado tornou minha caminhada mais suave e me deu forças para seguir em frente, fez da minha vida muito mais feliz e completa.*

*Aos meus irmãos, Andréia e Alex, aos meus sobrinhos Carol e Kayky e aos meus cunhados Rose e Eurico pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis e fatigantes.*

*Amo vocês!!!!*

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - SP, na pessoa do diretor Prof. Tit. Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Profa Dra. Rebeca Di Nicoló.*

*À Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, minha orientadora, por ter me aberto às portas do mundo da cultura celular, me convidado a entrar e dividido comigo, um pouco de seu amplo conhecimento. Por ter sido um exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino, por ter estado sempre à disposição quando precisei, e principalmente por ter acreditado e confiado em mim. Muito obrigada!*

*Ao Professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo, meu coorientador, por ter contribuído de forma incondicional com essa pesquisa, por ter colocado seu laboratório à nossa disposição, sempre que necessitamos, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e de determinação, pela sua gentileza e solicitude que sempre teve comigo. Muito obrigada!*

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira e da Vice-coordenadora Profa. Dra. Ana Lía Anbinder, muito obrigada pela dedicação, comprometimento, disponibilidade e seriedade de sempre.*

*Aos docentes do Programa de Biopatologia Bucal, pela colaboração e ensinamentos transmitidos. Em especial à Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, à Profa. Dra. Ana Lía Anbinder e à Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira por todo o incentivo, disposição em ajudar e ensinar, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre.*

*À Prof. Dra. Renata Falchete do Prado, pela ajuda inestimável nesta pesquisa nos momentos de maiores dificuldades.*

*Às minhas amigas Miriane Carneiro Salgado, Gabriela de Moraes Gouvêa Lima, Renata Moraes, Noala Vicensoto, Isabel Carvalho, Mônica Ghislaine Oliveira Alves, Renata Pilli Jóias, Laís Carvalho, Elis Andrade, Maria Fernanda Villaça, Juliana Santana e Pamela Aparecida Diniz, muito obrigada pela dedicação, atenção, e paciência em todos os momentos, foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Certamente as horas de convívio, as risadas, os problemas compartilhados, foram eternizados e solidificados para que dessem origem a uma das coisas, mais preciosas desta vida que se chama AMIZADE.*

*Aos amigos da microbiologia, Guilherme Teodoro, Jonatas Oliveira, Ana Luísa Rosário, Adeline Jorjão, Daiane Santos, Felipe Oliveira, obrigada pelo convívio, horas e conhecimentos compartilhados no laboratório, pelas risadas e amizade tornando a caminhada mais agradável.*

*À amiga Ritchelli Ricci, pela disponibilidade, paciência e pela ajuda inestimável, o mundo científico precisa de pessoas como você, compartilhar o conhecimento é uma sabedoria.*

*À Aline Santos, pela ajuda no preparo das amostras, sua colaboração foi essencial para a realização dessa pesquisa.*

*Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, pelos bons momentos, conversas e aprendizados.*

*Aos funcionários da secretaria de pós-graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka, Ivan Oliveira Damasceno e Sandra Mara Cordeiro, meu reconhecimento pelo desenvolvimento de seus trabalhos e preocupação em todas as atividades, a ajuda de vocês foi essencial.*

*Aos funcionários da UNESP ICT, que sempre me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.*

*À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa.*

*À tantas outras pessoas que auxiliaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.*

*Obrigada a todos pela ajuda nessa caminhada, por dividirem comigo o dia a dia nestes três anos e por tornarem a caminhada mais agradável.*

*Muito obrigada!*



*“Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor”*

*Madre Tereza de Calcutá*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| RESUMO .....   | 9  |
| ABSTRACT .....   | 10 |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 11 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA .....  | 14 |
| 3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO.....   | 27 |
| 3.1 Grupos experimentais.....  | 27 |
| 3.2 Obtenção dos <i>scaffolds</i> .....  | 27 |
| 3.2.1 Produção das soluções poliméricas.....   | 27 |
| 3.2.2 Eletrofiação das soluções poliméricas.....                                       | 28 |
| 3.2.3 Caracterização estrutural dos <i>scaffolds</i> .....                             | 28 |
| 3.3 Ensaio biológico <i>in vitro</i> .....   | 29 |
| 3.3.1 Cultura celular.....   | 29 |
| 3.3.2 Adesão e proliferação celular.....   | 31 |
| 3.3.3 Citotoxicidade celular (MTT).....  | 32 |
| 3.3.4 Vermelho de Alizarina.....   | 33 |
| 3.3.5 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real<br>(qRT-PCR)..... | 35 |
| 3.3.5.1 Extração de RNA.....   | 35 |
| 3.3.5.2 Síntese de cDNA (DNA complementar).....  | 36 |
| 3.3.5.3 Amplificação gênica por qRT-PCR.....   | 37 |
| 3.4 Análise estatística.....   | 38 |
| 4 Artigo.....  | 39 |
| 5 ANÁLISE DO ARTIGO.....   | 62 |
| 6 REFERÊNCIAS.....   | 64 |

Santana-Melo GF. Efetividade de *scaffolds* de poli (butileno adipato-co-tereftalato) / nanohidroxiapatita obtidos por eletrofiação para aplicação biomédica: avaliação *in vitro* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

## RESUMO

A necessidade da fabricação de novos biomateriais que possam, além de mimetizar o tecido ósseo, fornecer resistências mecânicas favoráveis próximas às do tecido ósseo natural têm despertado interesse de pesquisadores com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de pessoas que sofreram algum tipo de lesão. *Scaffolds* de nanofibras poliméricas fabricados por eletrofiação apresentam características tridimensionais (3D) e poros interconectados que permitem a colonização de toda a superfície 3D por células com a consequente formação de tecidos. O *scaffold* de poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) mostra-se um biomaterial promissor para regeneração óssea, porém tem sido pouco explorado até a data. Embora do uso da HA seja consagrado para uso biomédico, sua utilização em polímeros ainda é pouco estudada, principalmente em associação ao PBAT. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade *in vitro* de *scaffolds* poliméricos (PBAT) com incorporação de nanopartículas de HA (nHAp) em diferentes concentrações, produzidos por eletrofiação, por meio da bioatividade celular e expressão gênica de osteoblast-like MG63. Células (MG63) foram cultivadas sobre *scaffolds* de PBAT; PBAT/3%nHAp e PBAT/5% nHAp e sem a presença dos mesmos (controle) e avaliadas pelos testes qualitativo (MEV) e quantitativo de adesão e proliferação celular (1 e 7 dias e aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias, respectivamente), citotoxicidade celular (1, 3 e 7 dias), corante vermelho de alizarina e formação de mineralização (14 dias) e análise da expressão de genes relacionados à osteogênese por qRT-PCR aos 7, 14 e 21 dias de cultura celular. Os dados foram analisados estatisticamente por variância (ANOVA) e Tukey ( $p < 0,05$ ). Os *scaffolds* de PBAT e PBAT/nHAp não apresentaram efeito citotóxico e sua arquitetura tridimensional influenciou positivamente na adesão e proliferação celular, formação de matriz mineralizada bem como em alguns períodos na expressão dos genes ALP, Col I, Runx2, OC e OPN em relação ao grupo controle. O efeito osteocondutor e osteoindutor da nHAp promoveu melhor resposta celular nos *scaffolds* de PBAT/nHAp, independente da concentração. Esses resultados demonstram a efetividade *in vitro* dos *scaffolds* de PBAT e PBAT/nHAp, apresentando grande potencial para aplicação biomédica.

Palavras-chave: Eletrofiação. Nanofibras. PBAT. Nanohidroxiapatita. Células humanas (MG63). qRT-PCR. Regeneração óssea.

Santana-Melo GF. Effectiveness of novel scaffolds poly (butylene adipate-co-terephthalate) / nanohydroxyapatite obtained by electrospinning for biomedical application: *In vitro* evaluation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

## **ABSTRACT**

The need for the manufacture of new biomaterials that may, in addition to mimic to bone tissue, providing favorable mechanical strength close to natural bone have aroused the interest of researchers in order to improve the quality of life of people who have suffered some kind of injury. Scaffolds polymer nanofibers fabricated by electrospinning have three dimensional features (3D) and interconnected pores that allow the colonization of the entire 3D surface of cells with the consequent formation of tissue. Poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PABT) scaffold showed to be a promising biomaterial for bone regeneration, however, has been underexplored to date. Although the use of HA is consecrated to biomedical use, their use in polymers is not well known, especially in association with PBAT. The aim of this study was evaluating *in vitro* effectiveness of polymeric (PABT) scaffolds with incorporated HA (nHAp) nanoparticles, obtained by electrospinning, through cellular bioactivity and osteoblast-like MG63 gene expression. MG63 cells were grown on PABT; PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp scaffolds and without their presence (control), and evaluated by qualitative (MEV) and quantitative tests of cell adhesion and proliferation (1 and 7 days and at 1, 3, 7, 14 and 21 days, respectively), cell cytotoxicity (1, 3 and 7 days), alizarin red dye and mineralization formation (14 days) and expression of genes related to osteogenesis by qRT-PCR to 7, 14 and 21 days of cell culture. Data were statistically analyzed by variance (ANOVA) and Tukey test ( $p < 0.05$ ). The PBAT and PABT/nHAp scaffolds showed no cytotoxic effect and its three-dimensional architecture influenced positively in the cell adhesion and proliferation, mineralized matrix formation as well as in some periods the expression of genes ALP, Col I, Runx2, OC and OPN in relation the control group. The osteoconductive and osteoinductive effect of nHAp promoted better cellular response in scaffolds of PABT/nHAp independent of concentration. These results demonstrate the *in vitro* effectiveness of PABT and PABT/nHAp scaffolds, presenting great potential for biomedical application.

**Keywords:** Electrospinning. Nanofibers. PBAT. Nanohydroxyapatite. Human osteoblast-like cells (MG63). qRT-PCR. Bone regeneration.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o desenvolvimento de novos biomateriais naturais ou sintéticos têm despertado o interesse de pesquisadores com o objetivo de induzir e guiar uma rápida regeneração de maneira controlada, buscando a melhoria da qualidade de vida de pessoas que sofreram algum tipo de lesão. A reconstrução de defeitos ósseos é um procedimento realizado com frequência em cirurgias buco-maxilo-faciais e ortopédicas. O preenchimento local de tecido ósseo perdido, em decorrência de traumatismos, processos infecciosos, neoplasias e malformações congênitas representam um importante desafio às clínicas médicas e odontológicas. Neste contexto, torna-se importante a fabricação de novos biomateriais que possam, além de mimetizar o tecido ósseo, fornecer resistências mecânicas favoráveis próximas do tecido ósseo natural (Sato, Webster, 2004; O'Keefe, Mao, 2011; Oryan et al., 2014).

Para a osteogênese, as condições topográficas da superfície dos biomateriais são consideradas relevantes (Vasconcellos et al., 2008; Rosa et al., 2009; Wazen et al., 2010; Prado et al., 2015). Topografias nanoescalares oferecem um efeito significativo na resposta celular, provavelmente, modulando forças interfaciais que guiam a formação do citoesqueleto e a organização de receptores de membrana plasmática da célula, que por sua vez podem modificar sinalizações intracelulares, conseqüentemente estimulando a migração e proliferação celular (Sato, Webster, 2004; Wilson et al., 2005; Oryan et al., 2014). Os nanomateriais, de uma forma geral, são plataformas emergentes que podem ser usadas como *scaffolds* para estudos de regeneração de tecidos *in vitro* ou *in vivo* (Evans et al., 2006; Ferreira et al., 2008). Alguns exemplos de nanomateriais incluem tanto nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, nanohidroxiapatita (nHAp), nanodiamante cristalino (NCD) e nanotubos de carbono (CNT) quanto diversos substratos (polímeros, cerâmicas ou metais) projetados com poros ou tubos em nanoescala (Aryal et al., 2008; Kanjwal et al., 2010; Chow et al., 2011; Lobo et al., 2013; Rodrigues et al., 2016).

Diversas técnicas são propostas visando a fabricação destes biomateriais, porém a técnica de eletrofiação tem sido amplamente estudada para aplicação biomédica, devido à sua capacidade de produzir *scaffolds* fibrosos em 3D

semelhantes a matriz extracelular (MEC), apresentando características atraentes como nanofibras uniformes e contínuas em escala nanométrica, com elevada área superficial, elevada porosidade, interconectividade por toda a sua extensão e larga escala de produção (Ingavle, Leach, 2014; Khorshidi et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). Adicionalmente a técnica de eletrofiação é considerada uma abordagem simples de baixo custo e bastante versátil, podendo-se utilizar o mesmo sistema para processar materiais sintéticos ou naturais com fácil incorporação de componentes funcionais, tais como proteínas, fatores de crescimento, genes, enzimas, drogas, cerâmicas bioativas, entre outros, tornando-os ideais candidatos para aplicações em engenharia de tecidos (Zhou et al., 2012; Ribeiro Neto et al., 2015).

Tais nanofibras podem ser obtidas utilizando como matrizes polímeros naturais ou sintéticos. Para produção de novos *scaffolds*, os polímeros biodegradáveis têm sido amplamente investigados (Armentano et al., 2010; Okamoto, John, 2013), entre eles, destaca-se os poliésteres alifáticos sintéticos, tais como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico-co ácido glicólico) (PLGA), poli (caprolactona) (PCL) (Okamoto, John, 2013) e mais recentemente o poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (Fukushima F et al., 2012; Ribeiro Neto et al., 2015; Rodrigues et al., 2016).

PBAT é um copolímero alifático aromático que possui características atrativas como baixa cristalinidade, flexibilidade e um elevado alongamento à ruptura. É considerado completamente biodegradável e possui balanço ajustável entre a biodegradação e as propriedades físicas desejáveis (Jiang et al., 2006; Fukushima F et al., 2012). No entanto, assim como os demais polímeros têm algumas limitações, como baixa bioatividade. Para solucionar as desvantagens dos polímeros, novas estratégias buscam a incorporação de nanopartículas nas soluções poliméricas com a finalidade de associar melhores propriedades mecânicas com a biofuncionalidade da superfície do material, aumentando a bioatividade celular (Fukushima F et al., 2012; Ribeiro Neto et al., 2015; Siqueira et al., 2015).

A hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) sintética é muito semelhante ao componente mineral do osso natural em termos de microestrutura e dimensões, principalmente em escala nanométrica (nHAp) (Lobo et al., 2013; Becker et al., 2014), apresenta excelente biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade (Sonseca et al., 2012; Becker et al., 2014). Devido a estas propriedades, a hidroxiapatita (HA) é

um dos materiais mais estudados e empregados para reposição e regeneração do tecido ósseo (Sonseca et al., 2012; Lobo et al., 2013; Yu et al., 2013; Becker et al., 2014; Ribeiro Neto et al., 2015; Siqueira et al., 2015).

O sucesso da integração entre a superfície do biomaterial e a célula pode ser determinado por diferentes métodos, tais como testes de adesão, proliferação e viabilidade celular (MTT), quantificação dos nódulos de mineralização formados na superfície da amostra e por meio da morfologia celular que revela aspectos chaves sobre a interação da superfície com as células ósseas, bem como a expressão de genes relacionados à osteogênese (Castro-Raucci et al., 2011; Juillerat et al., 2012, Prado et al., 2015).

Baseado no fato de que superfícies tridimensionais podem modular e acelerar a resposta celular, o objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade “*in vitro*” de *scaffolds* poliméricos (PBAT) com incorporação de nanopartículas de HA (nHAp) em diferentes concentrações, produzidos por eletrofição, por meio da bioatividade e expressão gênica de osteoblast-like MG63, na busca de um novo biomaterial, que possa ser considerado ideal para uso biomédico.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biomateriais e nanotecnologia

Os biomateriais podem ser definidos como: “Qualquer substância ou combinação de substâncias, exceto fármacos, de origem sintética ou natural, que podem ser utilizados por um período de tempo para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente, tecidos ou órgãos” (Boretos, Eden, 1984). Esses materiais devem apresentar propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, visando estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais propriedades resultam em características de biocompatibilidade e biofuncionalidade. Os biomateriais sintéticos utilizados para fins biomédicos são metais, polímeros, cerâmicas e compósitos (Kawachi et al., 2000; Anderson et al., 2004; Ferreira et al., 2008). Podem ser classificados de acordo a resposta biológica causada no tecido hospedeiro:

- a) Bioinertes: materiais que quando implantados são tolerados pelo organismo e não sofrem rejeição, como polímeros, alumina, a zircônia, carbono, titânio e suas ligas;
- b) Bioativos: materiais que quando implantados interagem com células e tecidos e induzem atividade biológica específica, refletida na união através de ligações de natureza química entre o material, como vidros, vitrocerâmicos baseados em fosfatos de cálcio e hidroxiapatita;
- c) Materiais reabsorvíveis: após certo período de tempo em contato com os tecidos são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas, em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos desses materiais são os fosfatos tricálcicos ( $\alpha$  e  $\beta$ -TCP), polímeros e sulfato de cálcio (Xynos et al., 2001; Gorustovich et al., 2002; Vallet-Regí, Gonzalez-Calbet, 2010).



Materiais bioativos apresentam tipos distintos de fixação superficial, se comparados aos demais, ocorrendo numerosas reações químicas entre a superfície dos implantes e tecidos onde são implantados. A dependência do tempo de formação da ligação com o osso, o mecanismo de ligação, a espessura da camada de ligação e a resistência da ligação varia de acordo com o biomaterial. Uma característica comum entre todos os implantes bioativos é a formação de uma camada de hidroxicarbonato apatita (HCA) na superfície quando implantado. A fase HCA é equivalente em composição e em estrutura à fase mineral do osso. As camadas de HCA crescem como aglomerados policristalinos na superfície do implante. Fibrilas de colágeno são incorporadas aos aglomerados ligando o implante inorgânico com a matriz orgânica dos tecidos, então, a interface entre o osso e o implante bioativo é similar à ligação natural entre ossos (Kalita et al., 2007).

Implantes reabsorvíveis são projetados para se degradarem gradativamente com o tempo, sendo substituídos por tecidos naturais. O cumprimento de tais condições pode levar à regeneração dos tecidos ao invés da sua substituição. A taxa de reabsorção deve ser combinada com a taxa de reparação dos tecidos. Alguns materiais dissolvem rapidamente, enquanto outros vagarosamente. Alguns exemplos de implantes reabsorvíveis são as cerâmicas de fosfato tricálcico (TCP) que se degradam em cálcio, sais de fosfatos e polímeros e podem ser utilizados para preencher defeitos ósseos ou como parafuso de fixação ortopédica.

Implantes inertes formam uma camada fibrosa superficial. Estes tipos de implantes são bem-sucedidos somente quando estão bem ancorados, não permitindo que ocorram movimentos na interface. Quando isto não ocorre, a cápsula fibrosa pode ter centenas de micrômetros de espessura e o implante afrouxa rapidamente. O afrouxamento oriundo da falta de fixação conduz invariavelmente à falha clínica ou pela fratura do implante, ou pela fratura do osso adjacente (Navarro et al., 2008). Os implantes porosos foram desenvolvidos para prevenir tais afrouxamentos (Niinomi et al., 2012). O crescimento de tecido ósseo internamente entre os poros fornece uma grande área superficial entre o implante e o seu hospedeiro. Este método de fixação é conhecido como “fixação biológica”, que o designa capaz de suportar cargas bem maiores do que implantes fixados morfológicamente. Para que ocorram tais fenômenos, necessitam de tamanho de poros mínimos, na ordem de nanômetros,

para que suceda a vascularização, o que conseqüentemente permitirá o crescimento dos tecidos conectivos (Niinomi et al., 2012).

A nanotecnologia surgiu recentemente como uma nova área de pesquisa, empregando novas estratégias de design através da construção de estruturas, superfícies e dispositivos com precisão de nível atômico (Spear, Cameron, 2008). Considerando que a maioria dos biomateriais utilizados em implantes ortopédicos são bioinertes e necessitam de alta resistência mecânica, com o auxílio da nanotecnologia, é possível alterar a superfície desses biomateriais tornando-os bioativos, sem que percam suas características mecânicas, resultando na diminuição do tempo de reabilitação pós-cirúrgica e na melhora da qualidade de vida do paciente.

Os nanomateriais são denominados como materiais com unidade estrutural básica menor que 1000 nm, na forma de grãos, partículas, fibras ou outros constituintes. A utilização da nanotecnologia no desenvolvimento de nanobiomateriais é vista como promissora pelo fato destes serem análogos aos componentes nanoestruturados da matriz extracelular (MEC), despertando grande interesse na área de bioengenharia sobre o entendimento da interação material-hospedeiro que pode ser evidenciada tanto pelo comportamento das células quando em contato com a superfície do material, quanto pela adesão celular ao mesmo, sendo de grande relevância para a aplicação biomédica (Anderson et al., 2004; Lobo et al., 2013).

Os campos mais promissores dos biomateriais são suas aplicações em reconstrução de defeitos ósseos e implantes cirúrgicos, dentais ou ortopédicos, principalmente pelo aumento na expectativa de vida da população mundial, sendo os idosos um grupo de maior risco de fratura de tecido ósseo entre outras complicações sistêmicas (Vasconcellos et al., 2008; Niimomi et al., 2012), além de próteses de válvulas cardíacas, lentes intraoculares, dispositivos para assistência circulatória (Ratner, Bryant, 2004) e biomateriais com componentes funcionais, tais como proteínas, fatores de crescimento, genes, enzimas, drogas, cerâmicas bioativas, entre outros, tornando-os ideais candidatos para aplicações na engenharia de tecidos (Zhou et al., 2012; Weng, Xie, 2015).

Diversas técnicas são propostas visando a fabricação destes biomateriais, porém a técnica de eletrofiação tem sido amplamente estudada para aplicação biomédica, devido à sua capacidade de produzir *scaffolds* fibrosos em 3D semelhantes a matriz extracelular (MEC), apresentando características atraentes

como nanofibras uniformes e contínuas em escala nanométrica, com elevada área superficial, elevada porosidade, interconectividade por toda a sua extensão e larga escala de produção (Ingavle, Leach, 2014; Khorshidi et al., 2015).

## **2.2 Eletrofiação**

A eletrofiação via solução é um processo que consiste na aplicação de forças eletrostáticas e de arraste a uma solução polimérica com a finalidade de produzir fibras interligadas e com diâmetros muito pequenos, na ordem de nanômetros. Nesse processo, um eletrodo conectado a uma fonte de alta tensão elétrica (positiva ou negativa) é inserido numa solução polimérica contida em um tubo capilar. Inicialmente, a solução se mantém dentro do capilar pela tensão superficial, adquirindo o formato de uma gota na extremidade do mesmo. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se estende formando um cone. Isso ocorre quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da gota. O cone é conhecido como cone de Taylor. Como resultado de instabilidades viscoelásticas e elétricas, o 'cone' forma um jato carregado eletricamente que se subdivide em centenas de filamentos ou fibrilas. Durante a trajetória do jato ou das fibrilas até o coletor, o solvente evapora e o polímero forma uma manta não tecida, formada de nanofibras. O coletor pode ser aterrado ou pode ser conectado a uma fonte de alta tensão elétrica (Guerrini et al., 2006).

A principal vantagem dessa técnica é seu custo relativamente baixo comparado à maioria dos outros métodos. As amostras nanofibrílicas são uniformes e contínuas e, na maioria das vezes, não requerem métodos de alto custo para purificação. Adicionalmente, a técnica de eletrofiação é bastante versátil, podendo-se utilizar o mesmo sistema de eletrofiação para processar diferentes materiais, sintéticos ou naturais, com ou sem a adição de componentes biológicos como proteínas, fatores de crescimento e elementos da matriz extracelular (Huang et al., 2003; Burger et al., 2006; Bhardwaj, Kundu, 2010; Stachewicz, Barber, 2011).

Tais características singulares tornam a técnica extremamente atraente para a produção de materiais de aplicações tecnológicas das mais variadas. Dentre elas,

destacam-se a produção de filtros de alta eficiência (Jeong et al., 2007), tecidos tecnológicos de alta resistência, dispositivos eletrônicos e biossensores (Wang et al., 2004). A maior área de aplicação, e talvez a que melhor emprega o potencial da técnica e das propriedades de seus materiais, é a biomédica (Huang et al., 2003).

As nanofibras eletrofiadas possuem uma elevada área superficial, devido ao pequeno diâmetro de suas fibras e ao fato de elas formarem um não tecido. Além disso, possuem alta porosidade, devido à presença de poros tanto em suas fibras quanto entre o emaranhado de fibras, que forma uma estrutura tridimensional e totalmente interconectada por toda sua extensão (Burger et al., 2006; Patel et al., 2007).

A arquitetura das nanofibras eletrofiadas assemelha-se bastante com o ambiente natural das células no corpo humano, a matriz extracelular (MEC). Dessa maneira, o implante de materiais eletrofiados tem maior chance de favorecer a adesão e proliferação celular, facilitando o processo de reparação ou regeneração de tecidos. Tais nanofibras podem ser obtidas utilizando como matrizes polímeros naturais ou sintéticos (Ingavle, Leach, 2014; Khorshidi et al., 2015).

## **2.3 Polímeros**

Dentre os materiais utilizados como implantes e preenchimento de defeitos ósseos, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características mecânicas semelhantes aos dos materiais biológicos.

Polímero (poli=muitos e mero=partes) é definido como uma grande molécula de alto peso molecular formada pela repetição de pequenas estruturas ao longo da cadeia (meros), unidas por ligações covalentes (Lucas et al., 2001). Podem ser de origem natural formados de várias moléculas que se originam biologicamente, como proteínas e polissacarídeos, e sintéticos produzidos via reações de polimerização, que é uma reação química em que os monômeros (compostos químicos que reagem para formar os polímeros) transformam-se em macromoléculas (Lucas et al., 2001; Oréfice et al., 2006). Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise

simples, enquanto que os polímeros naturais são principalmente degradados enzimaticamente (Tabata, 2009). Ambos os polímeros, têm sido utilizados pela engenharia tecidual para o desenvolvimento de *scaffolds* tridimensionais para confecção de cartilagens, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais (Navarro et al., 2008).

Desde o início da civilização humana, faz-se uso de polímeros naturais para aplicações de biomateriais, como algodão, celulose e seda. Esses polímeros possuem cadeias de tamanhos bem próximos (monodispersidade), elevada especificidade e organização molecular (Oréfice et al., 2006). Já os polímeros sintéticos passaram a ser primeiramente utilizados como biomateriais a partir de 1940-1942 em suturas à base de poliamidas sintéticas (náilon). Posteriormente foram constatadas as primeiras aplicações de PMMA (Polimetilmetacrilato), PET (poli (tereftalato de etileno) e PVC (Policloreto de Vinila). Atualmente estes polímeros fazem parte do cotidiano dos centros cirúrgicos no mundo inteiro.

Dentre suas vantagens, destacam-se o fácil controle de síntese, origem ilimitada, não sofrem degradação mediada por células, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis. Contudo, possuem pouca resistência mecânica e sofrem redução de tamanho ao longo do tempo (Oh et al., 2006; Precheur, 2007).

Para solucionar as desvantagens dos polímeros, novos estudos têm sido realizados no intuito de desenvolver biomateriais sintéticos híbridos ou compósitos, que possuam as vantagens dos polímeros, porém com melhores taxas de reabsorção após a implantação, melhor resistência mecânica e melhor bioatividade celular (Wan et al., 2006; Lobo et al., 2013).

Vários polímeros biodegradáveis têm sido amplamente estudados nas duas últimas décadas com o objetivo de produzir biomateriais com a capacidade de melhorar a resposta biológica, uma vez que há degradação progressiva enquanto ocorre regeneração tecidual (Armentano et al., 2010; Okamoto, John, 2013; Son et al., 2013). Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB), policaprolactona (PCL), ácido polilático glicólico (PLGA) (Abedalwafa et al., 2013; Okamoto, John, 2013; Mohammadi et al., 2014) e mais recentemente o poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) (Fukushima F et al., 2012; Fukushima K et al., 2013; Ribeiro Neto et al., 2015; Rodrigues et al., 2016).

## 2.4 Poli (butileno adipato-co-tereftalato) PBAT

O poli (butileno adipato-co-tereftalato) (PBAT) é um polímero alifático aromático com balanço ajustável entre a biodegradação e as propriedades físicas desejáveis, é um polímero considerado completamente biodegradável (Fukushima F et al., 2012). Além disso, é flexível e possui maior alongamento na ruptura que a maioria dos polímeros biodegradáveis, tais como o ácido poli lático (PLA), muito utilizado em parafusos de fixação ortopédica (Bastarrachea et al., 2010). A parte alifática é responsável pela sua biodegradabilidade, e a parte aromática fornece melhores propriedades mecânicas comparadas a outros polímeros (Bittmann et al., 2012).

É comercialmente disponível, produzido pela empresa BASF (Alemanha) desde meados da década de 90. Também é conhecido por Ecoflex®, e foi o primeiro material totalmente biodegradável produzido pela empresa alemã, sua eficiência de biodegradabilidade e compostabilidade é comprovada por certificações europeias (EN13432) e norte-americanas (ASTM 6400).

O PBAT tem demonstrado elevado potencial para aplicações industriais e ambientais, e recentemente para possíveis utilizações na engenharia de tecidos (Yang F, Qiu, 2011; Fukushima F et al., 2012). Entretanto, a literatura reporta poucos trabalhos utilizando o PBAT, sendo que os principais referem-se ao uso deste polímero na preparação de blendas como as desenvolvidas por Pellicano et al. (2009), que avaliaram blendas de PHV / PBAT, Guerra (2010) que avaliou blendas de amido de mandioca / PBAT e Casarin (2004) que estudou blendas de PHB (poli-hidroxibutirato) / PBAT para fabricação de sacolas plásticas biodegradáveis, esses estudos objetivaram acelerar o processo de degradação das mesmas. Ainda há poucos estudos na literatura sobre o uso de PBAT e seus nanocompósitos para aplicações médicas.

Jao et al. (2010) estudaram a biocompatibilidade *in vitro* de filmes de PBAT e concluíram que este biopolímero apresenta potencial para ser utilizado em aplicações biomédicas por não apresentar citotoxicidade e promover proliferação celular, especialmente após modificação da superfície das amostras com heparina, ácido hialurônico e quitosana. Fukushima F et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade de

nanocompósitos de PBAT com diferentes concentrações de argilas para aplicações biomédicas, concluíram que os nanocompósitos não mostraram efeitos significativos de citotoxicidade de acordo com os testes preliminares de biocompatibilidade, sugerindo que o material é atraente para engenharia de tecidos.

Goes et al. (2012), avaliaram nanofibras de três polímeros biodegradáveis poli (D ácido láctico), PDLA, poli ( $\epsilon$ -caprolactona), PCL, e poli (butileno adipato-co-tereftalato), PBAT e seus nanocompósitos com uma nanoargila montmorilonita (MMT) produzidas por eletrofiação. A morfologia, o comportamento térmico e a estrutura interna das nanofibras foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e transmissão, calorimetria diferencial de varredura e difração de raios X, respectivamente. Os autores verificaram que as nanofibras dos nanocompósitos possuíam diâmetros menores do que os correspondentes polímeros puros e que as nanofibras de PBAT puro e de PBAT/MMT apresentaram a menor cristalinidade de todas as mantas. A viabilidade celular de todas as nanofibras foi analisada pelo teste de MTT. Os resultados mostraram que nenhuma manta nanofibrilica apresentou toxicidade às células e que as nanofibras de PBAT puro e seu nanocompósito propiciaram ainda um ambiente mais favorável ao desenvolvimento celular de fibroblastos e cardiomiócitos do que as condições oferecidas pelos controles, provavelmente por apresentarem menores diâmetros e baixa cristalinidade em relação às demais nanofibras. Estes resultados mostram o potencial de uso destas mantas nanofibrilicas como suportes de crescimento celular.

A principal limitação deste e de outros polímeros para aplicação médica é a fraca resistência mecânica, no entanto, verificou-se que a adição de partículas de tamanho nanométrico pode minimizar esta desvantagem, melhorando propriedades mecânicas, térmicas, além de induzir a osteogênese e acelerar o processo de osseointegração (Chivrac et al., 2006; Chen et al., 2011; Fukushima F et al., 2012).

Rodrigues et al., 2016 avaliaram a influência da incorporação de baixos teores de nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNT) superhidrofílicos em compósitos de PBAT. Os autores verificaram que os *scaffolds* de PBAT assim como os compósitos com incorporação de 0,1 e 0,5% de sMWCNT não foram citotóxicos, apresentaram maior atividade de ALP e maior incorporação do corante vermelho de alizarina em relação ao grupo controle. Os resultados dos testes de tração apontaram que sMWCNT agiu como reforço na matriz de PBAT, aumentando sua resistência à

tração. Em todos esses testes os melhores resultados foram exibidos pelo grupo PBAT / 0,5% sMWCNT. Porém, em relação à análise de ângulo de contato a maior concentração de sMWCNT (0,5%) exibiu valor elevado, apontando caráter hidrofóbico, assim como na análise térmica (DSC), onde a incorporação de 0,5% de sMWCNT diminuiu o grau de cristalinidade em relação ao grupo PBAT, em contrapartida, a incorporação de 0,1% de sMWCNT aumentou o grau de cristalinidade em relação aos demais grupos. Os autores concluíram que este estudo abre a possibilidade para a produção de *scaffolds* de PBAT com propriedades mecânicas e bioatividade melhoradas com potencial de aplicação em engenharia de tecidos e regeneração óssea.

Uma das grandes vantagens das matrizes poliméricas é que a melhoria de suas propriedades é obtida com pequenas concentrações de nanopartículas.

## **2.5 Hidroxiapatita (HA)**

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (Guastaldi, Aparecida, 2010).

A hidroxiapatita é um fosfato de cálcio de maior proeminência da fase mineral do tecido ósseo (cerca de 65%), é sem dúvida, a mais estudada e utilizada para finalidades clínicas e aplicações biológicas (Le Geros, 2002). A similaridade química superficial da HA sintética com a fase mineral do tecido ósseo promove adesão celular e permite a proliferação de células como fibroblastos e osteoblastos, as quais não a distinguem da superfície óssea natural, fazendo com que moléculas de água, proteínas e colágeno sejam adsorvidos em sua superfície, induzindo a regeneração tecidual, inclusive pela formação espontânea de apatitas biológicas (Kalita et al., 2007), principalmente na forma nanoestruturada (nHA).



A hidroxiapatita pode ser produzida sinteticamente em forma de pó, grânulos, blocos densos ou porosos que podem ser transformados em cerâmicas biocompatíveis e osteocondutoras, contudo seu uso clínico é limitado devido à sua lenta biodegradação, já que começa a ser biorreabsorvida gradualmente após quatro ou cinco anos de implante. Esse processo de reabsorção é uma característica desejada em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação. As principais aplicações da HA são em reparos de defeitos ósseos odontológicos e ortopédicos, regeneração guiada do tecido ósseo, equipamentos percutâneos, coadjuvante na colocação de implantes metálicos e recobrimento destes implantes (Oréfice et al., 2006; Vallet-Regí, Gonzalez-Calbet, 2010), e principalmente em situações em que há a necessidade de aumento de suporte ósseo como em reconstruções maxilo-faciais ou aplicações dentárias, atuando como suporte, promovendo o rápido preenchimento das cavidades com um novo osso, fazendo parte da estrutura óssea originada e reduzindo consideravelmente o tempo de recuperação quando comparados a situações nas quais não é usada como preenchimento ósseo. A HA também é utilizada no preenchimento de defeitos ósseos resultantes da remoção de vastas áreas de osso (remoção de tumores ósseos e defeitos decorrentes de traumas ou acidentes). No tratamento de tumores ósseos, a hidroxiapatita vem sendo utilizada como suporte de ação prolongada associada a fármacos anticancerígenos (Tanaskovic et al., 2007).

Outra forma de utilização é a formação de compósitos bioativos, em que se combina a HA com um material polimérico, o que possibilita a obtenção de um material mais leve, mas com propriedades biológicas superiores, além de seu uso como recobrimento, principalmente metais (Xiao et al., 2010; Lobo et al., 2013).

Braz et al. (2003) avaliaram a resposta biológica e poder indutor da combinação matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita. Foram produzidos defeitos ósseos em crânios de 20 ratos, *Wistar*, machos, divididos em dois grupos. No grupo I o defeito foi preenchido com uma associação de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita, ao passo que no grupo II considerado controle, nada foi empregado. Com 30 dias de pós-operatório a reabsorção óssea foi maior no grupo II. Aos 60 dias de pós-operatório, o grupo I apresentava uma maior quantidade de osteoblastos e presença de osso comparativamente ao grupo II. Os autores concluíram que a

combinação matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita não causa reações adversas e favorece a reparação óssea.

Becker et al. (2014) investigaram os efeitos de *scaffolds* compostos pelo polímero poli (fumarato de propileno)-co-poli (caprolactona) (PPF-co-PCL) e HA sobre a maturação de células pré-osteoblásticas e propriedades mecânicas. Verificaram que os módulos de compressão e de tração mudaram significativamente quando HA foi incorporada ao compósito e que a taxa de proliferação foi significativamente maior no compósito quando comparado somente com a matriz polimérica. Assim, estes resultados sugerem que *scaffolds* de HA/PPF-co-PCL/HA são capazes de induzir a maturação de pré-osteoblastos e apresentam potencial para serem utilizados na engenharia de tecido ósseo.

Haider et al. (2014) avaliaram o efeito da morfologia da hidroxiapatita nHA (nanohidroxiapatita) e sHA (hidroxiapatita esférica) na biocompatibilidade celular de *scaffolds* de nanofibras de poli (ácido láctico-co ácido glicólico). Os *scaffolds* de PLGA, nHA / PLGA e sHA / PLGA foram obtidos por eletrofiação e a partir dos estudos *in vitro* com células osteoblásticas MC3T3, os autores revelaram que o *scaffold* de nanofibras de nHA / PLGA apresentou maior adesão e proliferação celular, assim como aumento de cálcio na matriz extracelular em comparação com os *scaffolds* sHA / PLGA e PLGA. Os resultados mostram que a característica estrutural da HA pode afetar o potencial bioativo do *scaffold*, sendo a nHA mais atrente para aplicação biomédica.

A HA foi estudada por Li et al. (2015) como recobrimento da liga de titânio Ti6Al4V, foram avaliadas *in vitro* a adesão e proliferação de células MC3T3-E1 e a expressão dos genes runt-related transcription factor-2 (runx-2), fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN), osteocalcina (OC) e colágeno tipo I. Para avaliação *in vivo* as amostras foram implantadas em coelhos no cômulo femoral pelo período de 4 e 12 semanas. Os autores relataram adesão e proliferação celular significativamente melhorada pelo revestimento de HA em relação às superfícies não modificadas. Além disso, as células MC3T3-E1 cultivadas nas amostras de Ti6Al4V revestidas por HA exibiram expressão dos genes descritos significativamente maior em comparação com as amostras de Ti6Al4V sem recobrimento aos 14 dias de cultura. A análise de microtomografia revelou grande quantidade de osso neoformado ao redor dos implantes com recobrimento de HA em relação aos não recobertos. Portanto, este

estudo fornece uma alternativa bioativa para *scaffolds* de Ti6Al4V com propriedades melhoradas, promovendo a osteogênese e osseointegração para aplicações ortopédicas.

Ainda como revestimento a HA foi avaliada por Yang H et al. (2015), onde fabricaram nanohidroxiapatita (nHA) por processo de deposição simples hidrotermal de uma etapa em solução aquosa sob liga de magnésio (Mg). As amostras foram avaliadas por difração de raio-X para comprovação da presença da nHA, corrosão *in vitro* e teste de viabilidade celular (MTT) (Fibroblastos L-929). Os autores verificaram que o revestimento de nHA foi uniforme e homogêneo e melhorou significativamente a resistência à corrosão das amostras com revestimento em comparação com as não revestidas, assim, como no teste de viabilidade. Os resultados indicam que o revestimento nHA é promissor para melhorar as propriedades de corrosão e citocompatibilidade *in vitro* de implantes e dispositivos para engenharia de tecido ósseo à base de Mg. Além disso, o método de deposição hidrotérmico simples utilizado no presente estudo também é aplicável a substratos com superfícies complexas.

Estes e outros vários estudos ao longo dos anos comprovam que a HA é biocompatível, não apresenta toxicidade local ou sistêmica e atua de forma expressiva na osteogênese e na osseointegração. Embora o uso da HA seja consagrado para uso biomédico, sua utilização em polímeros ainda é pouco estudada, principalmente em associação ao PBAT.

## 2.6 Proteínas osteogênicas

Algumas proteínas importantes no processo de osteogênese, como colágeno tipo 1, fosfatase alcalina (ALP), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC) são expressas em momentos específicos e são, portanto, parâmetros importantes para o estudo da osteogênese em culturas de células (Beck Jr, 2003). Essas proteínas participam de diferentes eventos da osteogênese e da manutenção do tecido ósseo.

A formação óssea *in vitro* abrange a síntese inicial de matriz colágena não mineralizada, também conhecida como formação osteóide, que é posteriormente

remodelada com a maturação dos osteoblastos que passam a secretar as proteínas que permitirão a maturação dessa matriz, deposição de apatita biológica, mineralização e a formação de osteócitos (Stein et al., 1990; Robey et al., 1993; Ho et al., 2000).

No momento em que os osteoblastos são cultivados, há uma ativação de genes ligados à proliferação, expressão de marcadores fenotípicos como a ALP, osteopontina e osteocalcina. Nos primeiros dias de cultura, um intenso período de proliferação é refletido pela intensa atividade mitótica, com expressão de genes reguladores do ciclo e crescimento celular. Quando a proliferação cessa, o nível de ALP aumenta e dá-se o início da deposição ordenada da matriz extracelular e que finalmente resulta na organização do tecido ósseo com a formação de um arranjo ortogonal das camadas de colágeno entre os osteoblastos e a matriz extracelular mineralizada. Com o início da mineralização, acontece o aumento da expressão de algumas proteínas, como a sialoproteína, osteopontina e osteocalcina, paralelamente com a acumulação mineral (Owen et al., 1990; Stein, Lian, 1993).

Aproximadamente 90% do componente orgânico da matriz extracelular é composto por colágeno tipo I (Olsen, 1996). A ALP hidrolisa fosfatos orgânicos, liberando íons fósforo que são importantes para o processo de mineralização da matriz extracelular (Bellows et al., 1993). A OPN está envolvida na maturação da matriz extracelular. Ela é secretada nos estágios iniciais de desenvolvimento osteoblástico e de mineralização e age ligando as fases orgânica e inorgânica para promover adesão tecidual (Mckee, Nanci, 1995). Embora o mecanismo de ação da OC, proteína não colagênica mais abundante no tecido ósseo, não esteja totalmente elucidado, ela participa do processo de mineralização, em parte pela habilidade em se ligar à porção mineral do tecido ósseo, e da migração de osteoblastos e osteoclastos (Ducy et al., 1996; Bodine, Komm, 1999; Hoang et al., 2003).

Portanto, o conhecimento do mecanismo dos fatores envolvidos no processo da osteogênese é essencial para o desenvolvimento e avaliação de novos biomateriais com características semelhantes à da matriz extracelular, com o objetivo de promover a osteogênese e acelerar o processo de osseointegração.

### 3 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

O presente estudo foi realizado em parceria com a Universidade do Vale do Paraíba, onde as amostras experimentais foram preparadas no Laboratório de Nanotecnologia Biomédica sob a supervisão do Professor Dr. Anderson de Oliveira Lobo, responsável pelo laboratório.

#### 3.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas 66 *scaffolds* para cada grupo e os mesmos foram avaliados nos períodos de 1, 3, 7, 14 e 21 dias de cultura celular (MG63) de acordo com os testes celulares realizados. Os grupos foram divididos segundo a composição da amostra, PBAT (Poli (Butileno Adipato-co-Tereftalato)) e nHAp (nanohidroxiapatita):

G1: Grupo Controle (Apenas células);

G2: Grupo PBAT;

G3: Grupo PBAT/3%nHAp;

G4: Grupo PBAT/5%nHAp.

#### 3.2 Obtenção dos *scaffolds*

##### 3.2.1 Produção das soluções poliméricas

Para a produção das soluções poliméricas foi utilizado o polímero comercial PBAT fornecido pela BASF (Ecoflex\* F Blend C1200 – São Paulo, Brasil). Primeiramente foi dissolvido o PBAT (12% m/v) em 6 ml de clorofórmio por 2 horas sob agitação vigorosa. Separadamente, foram dispersados os pós de nHAp (3% e 5%

m/v) em 4 ml de DMF (Dimetilformamida - Sigma-Aldrich, St Louis, USA). As dispersões das nanocargas ocorreu por meio de agitação com uma ponteira de ultrassom (Sonics Vibra- Cell VCX-500, Biovera, Rio de Janeiro, Brasil) por 60 minutos. Após esta etapa, foram adicionados os respectivos grupos contendo as nanocargas às soluções de clorofórmio + PBAT (12% m/v) e foram mantidos sob agitação magnética durante 20 horas até a completa homogeneização em sistema fechado, com umidade e temperatura controlados.

### **3.2.2 Eletrofiação das soluções poliméricas**

As soluções poliméricas foram eletrofiadas em um sistema adaptado, de baixo custo relativo, utilizando uma fonte de alta tensão (BERTAN 230-30R, São Paulo, Brasil). O processo ocorreu a uma distância de 10 cm (agulha-coletor) e tensão de 14 Kv para eletrofiação do grupo PBAT e 18 Kv para o grupo PBAT/nHAp, à atmosfera ambiente de 21 – 23°C. Foram controlados também os parâmetros de umidade relativa do ar, sendo mantida de 40 a 60%. As amostras foram coletadas em um contra eletrodo plano de aço, recoberto por papel alumínio, no intuito de facilitar a remoção das mesmas. O processo de eletrofiação ocorreu até que as amostras atingissem uma espessura adequada (1 mm), com razão de fluxo 0,3 mL h<sup>-1</sup>, formando uma manta polimérica homogênea.

### **3.2.3 Caracterização estrutural dos *scaffolds***

As amostras dos respectivos grupos foram caracterizadas através de um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil). O equipamento opera em alto-vácuo com detector de elétrons secundários em voltagem de 12,5 HV e spot de 4,5. As imagens das fibras foram obtidas com o intuito de analisar a disposição e formato das fibras.

### 3.3 Ensaios biológicos *in vitro*

Todos os procedimentos biológicos *in vitro* foram desenvolvidos e executados no Laboratório de Estudos Interdisciplinares em Células (LEIC), localizado no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP – Univ Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Campus de São José dos Campos.

#### 3.3.1 Cultura celular

Previamente aos procedimentos *in vitro*, as amostras foram esterilizadas em luz ultravioleta (UV) no fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil) por 3 horas.

Foram utilizados osteoblastos humanos de uma linhagem celular estabelecida (MG63 *Cell Line Human*), provenientes do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil).

As células foram cultivadas em frascos para cultura celular de 250 mL e 75 cm<sup>2</sup> (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil) com meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-Life Technologies, NY, USA) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (SBF) (Gibco-Life Technologies, NY, USA), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco-Life Technologies, NY, USA), foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias e o desenvolvimento das células foi avaliado por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) até que as células atingissem a confluência, caracterizada pela ocupação de mais de 80% do frasco, após a confluência foram realizados subcultivos celulares.

Para o subcultivo celular, o meio DMEM do frasco de cultura foi aspirado com auxílio de pipeta sorológica e descartado, as células foram lavadas com PBS (Solução salina de tampão de fosfato) (Gibco-Life Technologies, NY, USA) e foi adicionado ao frasco 3 ml da solução de Tripsina/EDTA 0,25% (Gibco-Life Technologies, NY, USA),

para que as células se desprendessem do fundo do frasco. Posteriormente, o conteúdo de tripsina foi neutralizado com 6 ml de meio DMEM e o conjunto transferido para um tubo Falcon de 15 mL (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) e centrifugado em 3000 rpm por 5 minutos a 25°C (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) com consequente formação do pellet. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio DMEM e distribuídas em novos frascos de cultivo celular.

Após as expansões celulares, foi realizado o plaqueamento celular sobre as amostras experimentais em placas de 24 poços (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) para cada teste. Para esse procedimento, as células foram contadas através do contador automático Countess® (Invitrogen, USA) e foram plaqueadas aproximadamente 20.000 células/poço. Todos os testes foram realizados em quintuplicata (Figura 1).

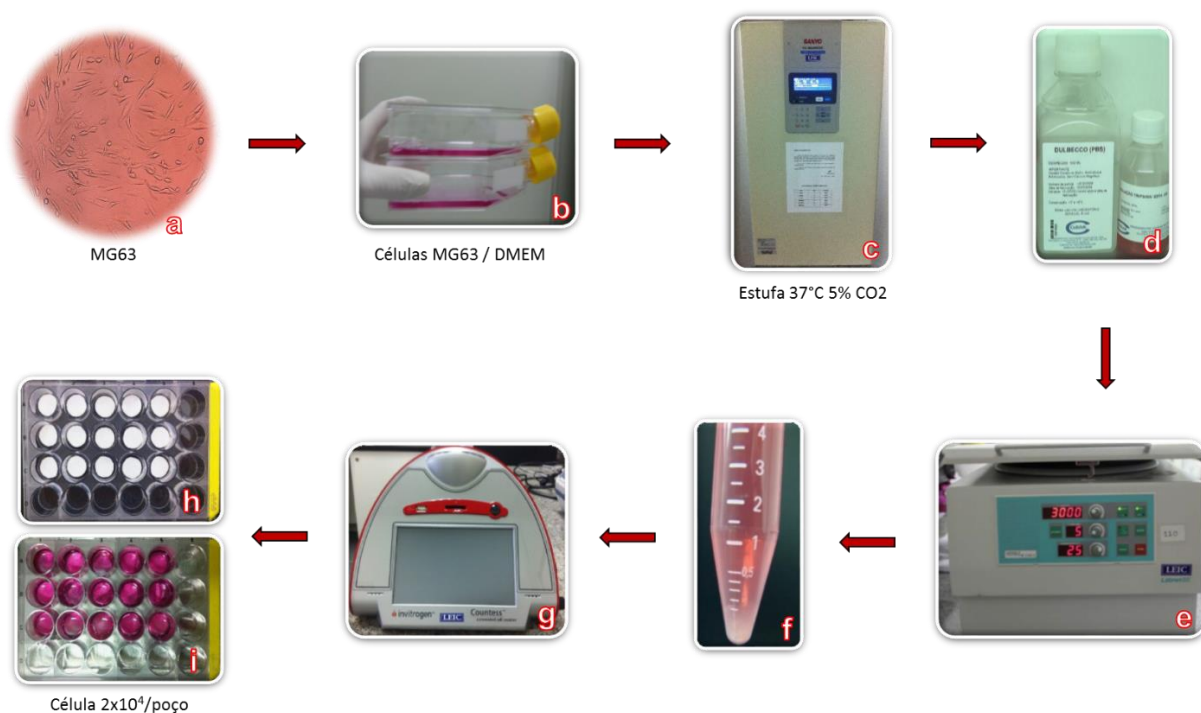


Figura 1 - Cultura Celular. a) Células MG63; b) Frasco para cultivo celular; c) Estufa; d) PBS e tripsina; e) Centrífuga; f) Pellet; g) Contador automático de células; h) Placa de 24 poços contendo amostras; i) Placa de 24 poços contendo amostras, meio para cultivo celular e células.



### 3.3.2 Adesão e proliferação celular

Para a avaliação da adesão e proliferação celular, as células foram cultivadas por 1, 3, 7, 14 e 21 dias sobre as amostras. O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes, com solução salina fosfato-tamponada (PBS) (Gibco-Life Technologies, NY, USA) a 37°C, para remoção de células não aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas das amostras com a utilização de 1 mM de EDTA e 0,25% de tripsina (Gibco-Life Technologies, NY, USA). As células foram coradas com azul de tripan e somente as células viáveis foram contadas por meio do contador automático Countess® (Invitrogen, USA) (Figura 2). Os valores obtidos foram expressos em número médio absoluto de células por grupo.

A adesão e proliferação celular foram também avaliadas por MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil). Após 1 e 7 dias de cultura, as amostras foram lavadas três vezes com PBS para remover as células não aderentes e, em seguida, fixadas quimicamente em paraformaldeído a 4% (Sigma Aldrich, St Louis, USA) à temperatura ambiente durante 20 minutos. As amostras foram, então, desidratadas através de uma série ascendente de etanol e antes da análise, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro usando um sistema sputter-revestimento.

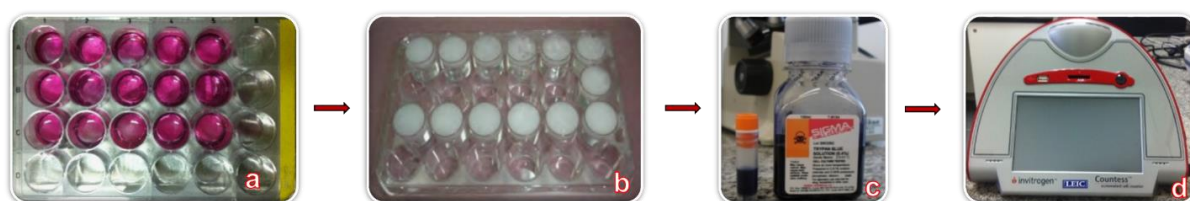


Figura 2 – Adesão e Proliferação Celular. a) Placa de 24 poços contendo amostras e células; b) Amostras com solução de tripsina; c) Corante azul de tripan 0,4%; d) Contador automático de células.

### 3.3.3 Citotoxicidade celular (MTT)

O método é baseado na avaliação quantitativa de células vivas, após a exposição ao agente tóxico pela incubação com o corante MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) (Mosmann, 1983). O MTT é um sal, que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis, produzindo um produto formazan, e então, efetua-se uma análise espectrofotométrica do corante incorporado. A quantidade de MTT, o marcador da viabilidade celular, incorporada pela população de células, é diretamente proporcional ao número de células vivas na cultura. O poliestireno da superfície da placa de cultura de 24 poços com o crescimento celular sem a imersão das amostras foi adotado como controle negativo (sem causar citotoxicidade) para validação do teste.

Para a avaliação da citotoxicidade celular, as células foram cultivadas nos poços sobre as amostras e avaliadas nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Alíquotas de MTT a 0,5 mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas com esta solução por 1 hora a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS aquecido a 37°C. Em seguida, foi adicionado 500 µL de solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide - Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em cada poço sob agitação em mesa agitadora orbital (Solab SL180/A, Piracicaba, SP - Brasil) por 20 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em leitor de microplaca no comprimento de onda de 570 nm (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, USA) (Figura 3). Os dados foram expressos como densidade óptica em comparação ao grupo controle.

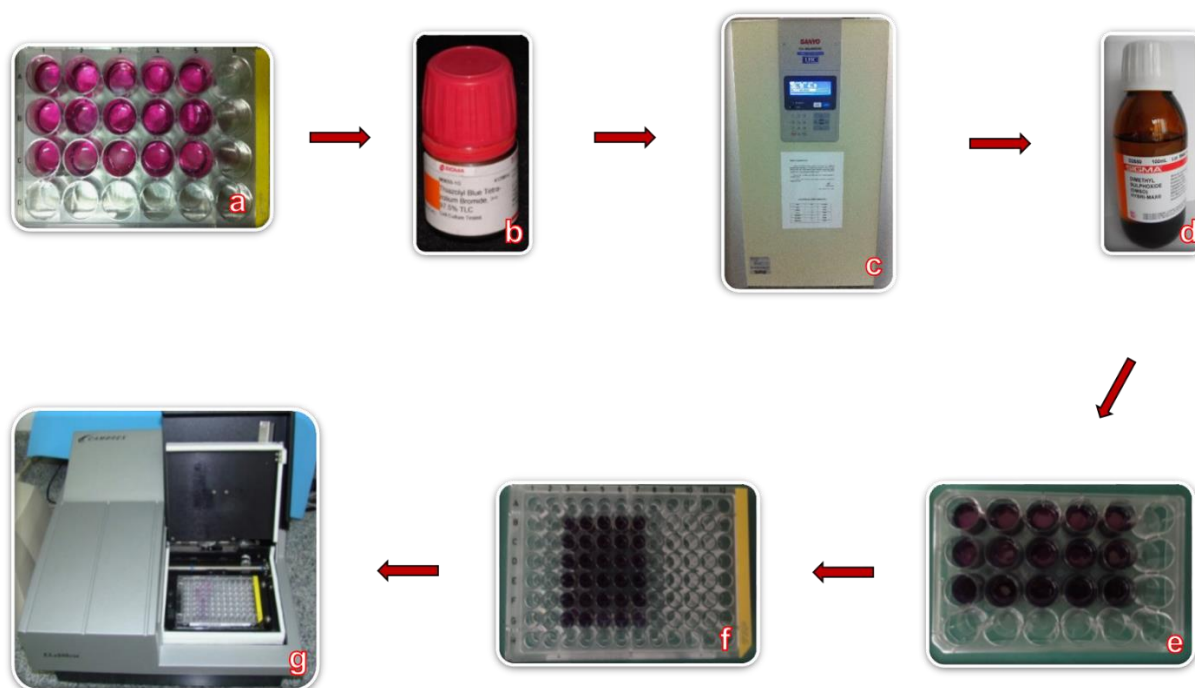


Figura 3 – Citotoxicidade celular. a) Placa de 24 poços contendo amostras e células; b) Sal MTT; c) Estufa; d) DMSO; e) Placa de 24 poços com DMSO; f) Placa de 96 poços contendo as alíquotas para leitura; g) Espectrofotometro 570 nm.

### 3.3.4 Vermelho de alizarina

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 14 dias de cultura. Para tanto, as células aderidas sobre as amostras foram lavadas em 1 mL de solução de Hank's (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) a 37°C por três vezes e fixadas em 2 mL de álcool 70% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) por 1 hora a 4°C. Em seguida, o álcool foi retirado e as células foram lavadas com 1 mL PBS gelado por duas vezes. Posteriormente, o PBS foi retirado, as células foram lavadas com 1 mL de água deionizada por duas vezes e coradas com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), pH 4,2, por 15 minutos à temperatura ambiente, as células foram novamente lavadas com água deionizada e secas por 24 horas em temperatura ambiente. Para detecção microscópica de formação de nódulos semelhantes ao osso mineralizado os espécimes foram fotografados com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels) acoplada em microscópio de luz invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

Para quantificação de acúmulo de cálcio, uma vez que o corante vermelho de Alizarina S cora áreas que são ricas em cálcio, o corante foi extraído de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004). Para tanto, 560  $\mu$ L de ácido acético 10% foi adicionado a cada um dos poços contendo as amostras e incubados em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, cada uma das amostras foi raspada com auxílio de uma ponteira, para a remoção de maior quantidade de corante. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga com 1,5 mL e agitados em vórtex (Vórtex QL – 901, Biomixer, Brasil) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria (Banho Metabólico Dubnoff – MA- 095/CF, Marconi, Piracicaba, Brasil) e aquecidos por 10 minutos, a 85°C sendo posteriormente transferidos para um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados (Centrífuga Labnet– HERMLE Z 300K, NJ, USA) por 20 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação, 100  $\mu$ L dos sobrenadantes foram transferidos para placa de 96 poços e foram acrescidos 40  $\mu$ L de hidróxido de amônia a 10%, para neutralização do ácido. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, USA), sob o comprimento de onda de 405 nm (Figura 4). A intensidade da cor foi proporcional à deposição de cálcio e os valores foram expressos como densidade óptica.

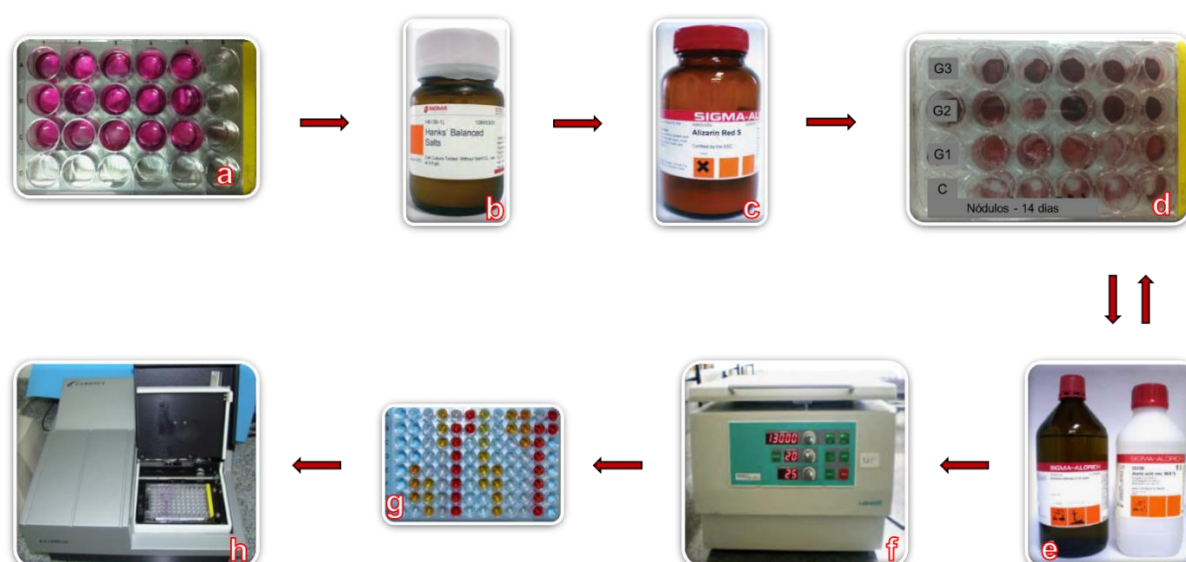


Figura 4 – Vermelho de Alizarina. a) Placa de 24 poços contendo amostras e células; b) Sal de Hank's; c) Corante Vermelho Alizarina S; d) Placa de 24 poços contendo cálcio e matriz mineralizada corados com vermelho de alizarina; e) Reagentes de hidróxido de amônia e ácido acético; f) Centrífuga; g) Placa de 96 poços contendo as alíquotas para leitura; h) Espectrofotômetro 405 nm.

### 3.3.5 Análise de expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise de expressão gênica foram utilizados genes envolvidos na osteogênese, descritos na tabela 1. A figura 5 demonstra a metodologia resumida.

Tabela 1 - Sequência dos primers e propriedades das reações

| Genes              | Sequência foward/reverse                                   | T.M. (°C)    | PB | Ref. Fast Pubmed |
|--------------------|--|--------------|----|------------------|
| Fosfatase Alcalina | F: CCGTGGCAACTCTATCTTTGG<br>R: GCCATACAGGATGGCAGTGA        | 55.8<br>57.2 | 21 | NM_000478.4      |
| Osteocalcina       | F: AAGAGACCCAGGCGCTACCT<br>R: AACTCGTCACAGTCCCGGATTG       | 60.6<br>57.1 | 21 | NM_199173        |
| Osteopontina       | F: AGACACATATGATGGCCGAG<br>R: GGCCTTGATGCACCATTCAA         | 54.4<br>55.9 | 21 | NM_1251830       |
| Colágeno TI        | F: CCCTGGAAAGAATGGAGATGAT<br>R: ACTGAAACCTCTGTGTCCCTTCA    | 54.4<br>58.0 | 23 | NM_000088.3      |
| Beta Actina        | F: ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA<br>R: TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA | 60.3<br>57,1 | 24 | NM_001101        |
| Runx2              | F: AGCAAGGTTCAACGATCTGAGAT<br>R: TTTGTGAAGACGGTTATGGTCAA   | 56.3<br>54.6 | 23 | NM_004348        |

T.M. – temperatura de melting; Pb – tamanho do produto (pares de base).

#### 3.3.5.1 Extração de RNA

Aos 7, 14 e 21 dias de cultura celular, foi realizada a extração do RNA total das células aderentes aos *scaffolds* poliméricos PBAT, PBAT/3%nHAp, PBAT/5%nHAp e do grupo controle utilizando o protocolo do *RNAeasy*<sup>™</sup> mini kit (Qiagen, São Paulo, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente as células foram tripsinizadas das amostras e centrifugadas (3000 rpm) em tubos falcon de 15 ml para a formação do pellet, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 600 µL do buffer RLT, foi adicionado ao tubo 350 µL de etanol 70% e a mistura foi homogeneizada imediatamente. Em seguida,

700  $\mu$ L da mistura foi transferido para uma coluna de *RNAeasy mini spin* contida em um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 10.000 rpm por 15 segundos a temperatura ambiente por duas vezes. Após a centrifugação, todo conteúdo do tubo coletor foi descartado e adicionado a coluna 700  $\mu$ L do buffer RW1 com posterior centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm. Todo conteúdo do tubo coletor foi novamente descartado e o procedimento foi repetido duas vezes com adição de 500  $\mu$ L do buffer RPE sendo a última centrifugação realizada por 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 40  $\mu$ L de água ultrapura DEPC livre de RNAase / DNAase, seguido de centrifugação por 1 min a 10.000 rpm. As concentrações e purezas das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. - Wilmington, DE 19810, USA). Foram aceitos valores de A260/A280 entre 1,8 e 2,0. O RNA foi armazenado a -80°C até a realização da síntese de cDNA.

### **3.3.5.2 Síntese de cDNA (DNA complementar)**

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, São Paulo, Brasil). A um tubo eppendorf de 2 mL foram adicionados 2  $\mu$ g de RNA total, 1  $\mu$ L de Oligo dT (0,5mM) e água ultrapura DEPC até completar um volume de 5  $\mu$ L. As amostras foram incubadas a 70°C por 5 minutos seguido de um período de 5 minutos a 4°C. Após a incubação foi adicionada as amostras uma mistura de 4  $\mu$ L de Buffer mix 5x, 2,4  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (3mM), 0,5  $\mu$ L de Recombinant RNAsin®, 1  $\mu$ L de dNTP mix (0,5 mM), 1  $\mu$ L de Reverse Transcription System ImProm-II™ e 6,1  $\mu$ L de água DEPC, para um volume final de 20  $\mu$ L. O tubo contendo as amostras foi novamente incubado a 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 minutos e a 70°C por 15 minutos. Toda incubação foi realizada em termociclador Veriti 384-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). O cDNA resultante foi armazenado a -20°C até sua utilização.

### 3.3.5.3 Amplificação gênica por qRT-PCR

Para a análise de expressão gênica foi realizada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, São Paulo, Brasil) e o equipamento ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Para cada reação, 2 µL de cDNA foi adicionado a 10 µL de BRYT® Green, 1 µL do primer forward (0,5 µM), 1 µL do primer reverse (0,5 µM) e 6 µL de água DEPC, com volume final de 20 µL. Todas as reações foram feitas em duplicata. A ciclagem térmica consistiu em: ativação a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (etapa de desnaturação), 60°C por 1 minuto (etapa de anelamento e extensão). Um ciclo final de 5 minutos a 72°C para a curva de dissociação foi realizado a fim de garantir as condições ótimas da reação e a confiabilidade dos resultados.

Os dados foram normalizados com base na expressão do gene de referência, para seleção do controle endógeno mais adequado, três genes de referência: *GAPDH* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *18SrRNA* (18S ribossomal RNA), e *β-actina* (Actina de músculo liso-beta) foram analisados sendo escolhido o mais estável, ou seja, aquele que apresentou menor variação nas condições experimentais propostas no estudo. Após determinação dos padrões da qRT-PCR, os valores de Ct das amostras foram utilizados nos cálculos. A média de cada gene alvo foi calculada para todas as amostras e foi subtraído o Ct do gene de referência escolhido, utilizando a fórmula:

$$\Delta Ct, \Delta Ct = Ct (\text{gene alvo}) - Ct (\text{gene de referência})$$

O  $\Delta Ct$  foi subtraído do gene calibrador resultando em  $\Delta\Delta Ct$ ,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{gene alvo}) - \Delta Ct (\text{gene calibrador})$ . Todos os grupos experimentais foram calibrados pelo grupo controle. Por fim, a quantificação relativa (RQ - Relative Quantification) foi calculada para cada gene em cada amostra conforme a equação:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, Schmittgen, 2001).

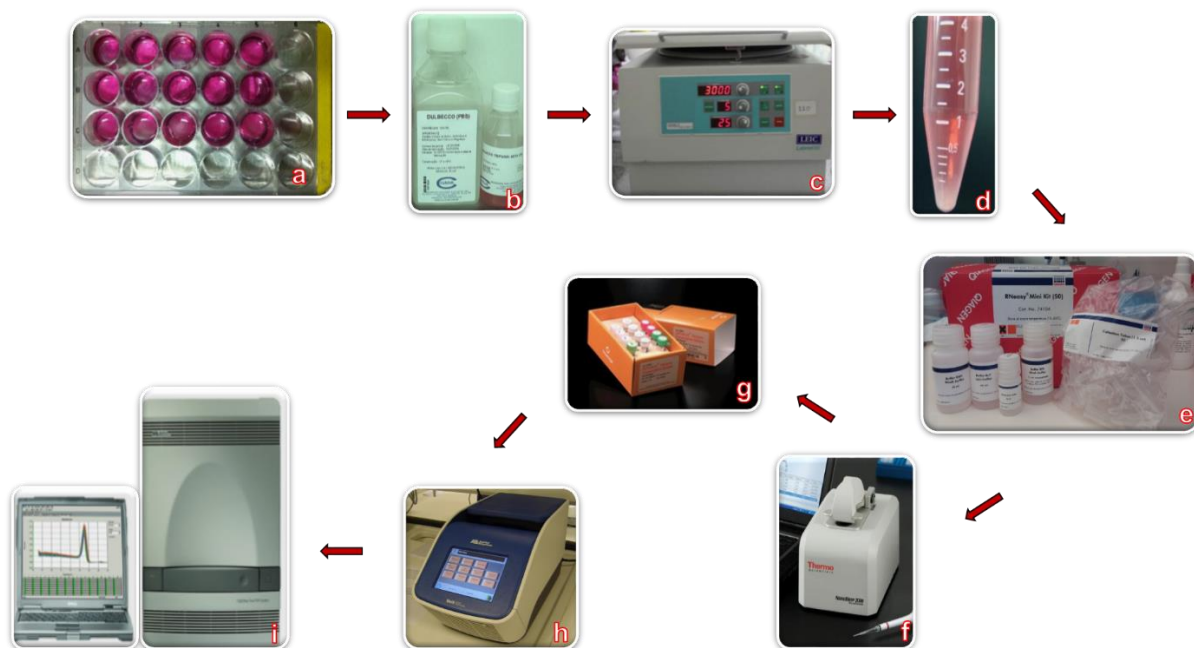


Figura 5 – qPCR-RT. a) Placa de 24 poços contendo amostras e células; b) PBS e tripsina; c) Centrífuga; d) Pellet; e) Kit para extração de RNA; f) NanoDrop 2000; g) Kit para síntese de cDNA; h) Termociclador; i) Equipamento de qPCR-RT.

### 3.4 Análise estatística

Todos os dados foram analisados por meio do teste de normalidade, sendo os resultados paramétricos submetidos ao teste de variância two way ANOVA (tempo *xs scaffolds*) complementado pelo pós-teste de Tukey a fim de verificar as diferenças estatísticas entre grupos. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA), os resultados foram apresentados como média desvio  $\pm$  padrão e foi adotado nível de significância de 5%.



## 4 ARTIGO

### **4.1 Artigo - Effectiveness of novel scaffolds poly (butylene adipate-co-terephthalate) / nanohydroxyapatite obtained by electrospinning for biomedical application: *In vitro* evaluation\***

Effectiveness of novel scaffolds poly (butylene adipate-co-terephthalate) / nanohydroxyapatite obtained by electrospinning for biomedical application: *In vitro* evaluation

Gabriela F. Santana-Melo<sup>1</sup>, Ritchelli Ricci<sup>2</sup>, Bruno V. M. Rodrigues<sup>2</sup>, Fernanda R. Marciano<sup>2</sup>, Anderson O. Lobo<sup>2\*</sup>, Luana M. R. Vasconcelos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Bioscience and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology, São Paulo State University (UNESP), Av. Engenheiro Francisco Jose Longo 777, São Jose dos Campos, São Paulo, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratory of Biomedical Nanotechnology, Institute of Research and Development (IP&D), University of Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi 2911, São Jose dos Campos, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author: \*Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo. Email: aolobo@pq.cnpq.br and lobo.aol@gmail.com (Phone: + 551239471100). Laboratory of Biomedical Nanotechnology, Institute of Research and Development (IP&D), University of Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi 2911, São Jose dos Campos, São Paulo, Brazil.

## Abstract

Poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PABT) scaffold showed to be a promising biomaterial for bone regeneration, however, has been underexplored to date. Although the use of HA is consecrated to biomedical use, their use in polymers is not well known, especially in association with PBAT. The aim of this study was to evaluate *in vitro* effectiveness of polymeric (PABT) scaffolds with incorporated HA (nHAp) nanoparticles, obtained by electrospinning, through cellular bioactivity and osteoblast-like MG63 gene expression. MG63 cells were grown on PABT; PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp scaffolds, and evaluated at 1, 3, 7, 14 and 21 days of cell culture by morphology, adhesion, proliferation and cell viability, alizarin red and expression of genes related to osteogenesis by qRT-PCR. Data were statistically analyzed by variance (ANOVA) and Tukey test ( $P < 0.05$ ). The scaffolds showed no cytotoxic effect and its three-dimensional architecture influenced positively in the adhesion, proliferation and cell viability, mineralized matrix formation as well as in some periods the expression of genes ALP, Col I, Runx2, OC and OPN in relation the control group. The osteoconductive and osteoinductive effect of nHAp promoted better cellular response in scaffolds of PABT/nHAp, independent of concentration. These results demonstrate the *in vitro* effectiveness of PABT and PABT/nHAp scaffolds, presenting great potential for biomedical application.

## 1 Introduction

In recent decades, the development of new natural or synthetic biomaterials have aroused the interest of researchers in order to induce and guide a fast regeneration in a controlled manner, seeking to improve the quality of life of people who suffered some kind of injury. The reconstruction of bone defects such as local filling of lost bone tissue, result of trauma, infectious processes and cancer or congenital malformations is a procedure performed frequently in maxillo-facial and orthopedic surgeries and it represents a major challenge to medical and dental clinics [1].

Topographic features of biomaterials surface are extremely important because they act directly on the cellular response, stimulating migration, adhesion,

differentiation and cell proliferation [2,3]. In this context, it becomes important the manufacture of new biomaterials that may mimic properties of natural bone tissue, besides presenting adequate mechanical characteristics, resulting in improved biofunctionality [4,5].

Several techniques are proposed for the manufacture of these biomaterials, however, electrospinning technique has been extensively studied for biomedical applications due its ability to produce 3D fibrous scaffolds similar to extracellular matrix (ECM), presenting attractive features such as uniform and continuous nanofibers in nanoscale, with elevated surface area, high porosity, interconnectivity throughout its extension and large-scale production [6]. Additionally, electrospinning technique is considered a simple approach of low-cost and very versatile, since the same system may be used for processing natural or synthetic materials, with easy incorporation of functional components, such as proteins, growth factors, genes, enzymes, drugs, bioactive ceramics and others, making them ideal candidates for tissue engineering applications [7-10].

Such nanofibers can be obtained using natural or synthetic polymers as matrices. For production of novel scaffolds, biodegradable polymers have been extensively investigated [11,12]. Among them, the synthetic aliphatic polyesters stand out, such as poly (lactic acid) (PLA), poly (glycolic acid) (PGA), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly (caprolactone) (PCL) [12] and more recently, poly (butylene adipate-co-terephthalate) (PABT) [6,10,13].

PABT is an aromatic aliphatic polymer with attractive features such as low crystallinity, flexibility and a high elongation at break. It is considered completely biodegradable and it has adjustable balance between biodegradation and desirable physical properties [13-15]. However, like other polymers, it shows some limitations, such as low bioactivity. In order to solve the disadvantages of the polymers, new strategies seek the incorporation of nanoparticles in the polymeric solutions to associate the best mechanical properties with biofunctionality of the material surface, increasing cellular bioactivity [10,13,16].

Synthetic hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) is very similar to the mineral component of natural bone in terms of dimensions and microstructure, especially in nanoscale (nHAp) [3,17], exhibits excellent biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity [17,18]. Due to these properties, hydroxyapatite (HA) is one of the

most studied and used materials for replacement and regeneration of bone tissue [3,10,16,17,18,19].

Based on the fact that three-dimensional surfaces can modulate and accelerate cell response, the aim of this study evaluated *in vitro* effectiveness of polymeric scaffolds (PBAT) with incorporation of HA nanoparticles (nHAp) at different concentrations, produced by electrospinning, through bioactivity and gene expression of osteoblast-like MG63, aiming to find a new ideal biomaterial for biomedical use.

## 2 Material and methods

### 2.1 Preparation of scaffolds PBAT and PBAT/nHAp: Electrospinning process

Electrospinning was performed from solutions containing PBAT 12 wt.% and two different concentrations of nHAp (3 and 5 wt.%, further referred as PBAT/3%nHAp and PBAT/5%nHAp, respectively) using chloroform/DMF (60/40) as solvent system. A sample PBAT (12 wt.%, referred only as PBAT), was dissolved in chloroform during 120 min under vigorous, stirring while the nHAp were dispersed in DMF under sonication (VCX 500 — Sonics) during 60 min. After the dispersion, the nHAp in DMF were added to the PBAT solution, under stirring, during 20 h until complete homogenization. Electrospinning optimal conditions were established as follows: voltage tension (14 kV for PBAT and 18 kV for PBAT/nHAp), 10 cm as needle-collector distance, solution flow rate of 0.3 mL h<sup>-1</sup>, controlled temperature (21–23 °C) and humidity (44–54%).

### 2.2 Scaffolds characterization

FE-SEM (Field Emission Scanning Electronic Microscopy) was performed using a Zeiss – EVO MA10. Prior to analysis, the samples were coated with a thin layer of gold using a sputter-coat system. The images of the fibers were obtained in order to analyze the distribution and format of the fibers.

### 2.3 Cell culture

The MG63 osteoblast-like cell line for in vitro testing was obtained from the Cell Bank Association of Scientific Technical Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, Brasil) and cultured in  $\alpha$ -Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Life Technologies, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-Life Technologies, NY, USA), 100 U/ml penicillin (Gibco-Life Technologies, NY, USA) and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Gibco-Life Technologies, NY, USA) in 75 cm<sup>2</sup> flasks (TPP, Biosystems, Curitiba, Brasil). Cells were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37°C, and the medium was changed every 2 days. When confluent, cells were enzymatically removed using 0.25% trypsin and 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in phosphate buffered saline (PBS) (Gibco-Life Technologies, NY, USA), centrifuged, resuspended, and counted in automated Cell Counter Countess® (Invitrogen, USA). Cells at passage 2–3 were plated on the sterile scaffolds of PBAT, PBAT/3%*n*HAp and PBAT/5%*n*HAp in 24-well polystyrene plates (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil), at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well for period of up to 21 days with same supplemented medium above. For evaluating the progression of the cell culture, the cells were grown in 24-well polystyrene plates (TTP, Biosystems, Curitiba, Brasil) at a density of  $2 \times 10^4$  cells / well in the absence of scaffold and used as control for all in vitro analysis. Previously the samples were placed into well plates and sterilized in absolute ethanol under ultraviolet lamp for 3 hours, followed by immersion in 10 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma Aldrich) for 24 h. All tests were development in accordance with ISO-10993-5.

### 2.4 Cell adhesion and proliferation

Cell adhesion and proliferation were analyzed after 1, 3, 7, 14 and 21 days of contact with specimens from each group. Cells grown were enzymatically removed using 1mM EDTA and 0.25% trypsin (Gibco-Life Technologies, NY, USA). Next, the cells were stained with trypan blue (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and counted in automated Cell Counter Countess® (Invitrogen, USA). The values were expressed as the mean absolute number of cells per group.

Adhesion and proliferation cellular were further evaluated by FE-SEM (Field Emission Scanning Electronic Microscopy) (Zeiss - EVO MA10, São Paulo, Brasil).

After 1 and 7 days of culture, the samples were rinsed three times with PBS to remove non-adherent cells and then chemically fixed in a 4% paraformaldehyde at room temperature for 20 min. The samples were then dehydrated through an ascending series of ethanol and prior to analysis, the samples were coated with a thin layer of gold using a sputter-coat system.

## 2.5 Cell cytotoxicity

After being cultured for 24 h, 3 and 7 days the cell cytotoxicity was determined by the MTT assay [20] (3-[4-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (Sigma Aldrich, St Louis, USA). The MTT assay is based on the reduction of yellow tetrazolium salt to purple formazan crystals by dehydrogenase enzymes secreted from the mitochondria of metabolically active cells, is currently used once the optical density (OD) values can provide indicators of the cell growth on biomaterials. Cells were incubated with MTT (0,5 mg/mL) at 37°C for 1 hour to form purple formazan crystals. Next, the supernatant was removed and the samples were washed with PBS, followed by the addition of 1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma Aldrich, St Louis, USA) to each well. The plates were then stirred on a plate shaker for 20 min to dissolve the formazan crystals, 200  $\mu$ L of this solution were transferred to a 96-well plate, and colorimetric analysis was performed for each well using a reference wavelength of 570 nm on the spectrophotometer (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, USA) and data were expressed as optical density compared to the control group.

## 2.6 Alizarin red staining

After 14 days in culture, the cells were washed three times with Hank's solution (Sigma Aldrich, St Louis, USA) at 37 °C, and fixed with 70% ethanol for 1 h at 4 °C. Following fixation, the samples were washed twice with PBS and stained with 2% Alizarin red S (Sigma Aldrich, St Louis MO, USA), pH 4.2, for 15 min at 37 °C. The samples were washed with deionized H<sub>2</sub>O and left to dry for 24 h at 37 °C. The mineralized bone-like nodule formation was visualized by inverted light microscope (Zeiss MicroImaging GmbH Carl Microscope - Axiovert 40C, Germany). Then the dye

was extracted according to the colorimetric method previously described by [21], at where, 560  $\mu\text{L}$  of 10% acetic acid was added to each well, followed by 40  $\mu\text{L}$  of 10% ammonia hydroxide in order to neutralize the acid. After the extraction of the dye, the absorbance was measured in a spectrophotometer (EL808IU Biotek Instruments, Winooski, USA) at a wavelength of 405 nm. The color intensity, was proportional to the calcium deposition and the values were expressed as optical density.

## 2.7 Gene expression analysis by qRT-PCR

To determine the relative expression level of osteogenic markers, alkaline phosphatase (ALP), osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), collagen I (COL I) and runt-related transcription factor 2 (Runx2) were analysed by real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) on days 7, 14 and 21. Total RNA extraction was performed on cells adhering to the scaffolds using RNAeasy™ mini kit (Qiagen, São Paulo, Brasil), according to the manufacturer's instructions. The concentrations and purity of RNA specimens were determined by optical density in a spectrophotometer Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. — Wilmington, DE-19810, USA). Values of A260/A280 between 1.8 and 2.0 were accepted.

Complementary desoxyribonucleic acid (cDNA) was synthesized using 2  $\mu\text{g}$  de RNA through a reverse transcription reaction following the manufacturer's instructions of the commercial kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, São Paulo, Brasil). The cDNA was used for real time PCR with the detection system ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA), using kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, São Paulo, Brasil) and Primers (Table 1). The standard PCR conditions were 95 °C (5 min), 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 60 °C (1 min) and a final cycle of 5 min at 72 °C. Each assay was run in duplicate.

Data were normalized based on the expression of the reference gene, for selection of the most appropriate endogenous control, three reference genes: GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), 18SrRNA (18S ribosomal RNA), and  $\beta$ -actin (Actin smooth muscle-beta) were evaluated, and determined  $\beta$ -actin as preferred reference gene.

After the qRT-PCR reactions, the Ct values of specimens were used for relative quantification by the comparative method of  $\Delta\Delta\text{Ct}$  [22], in which the genic

expression occurs in relation to the reference gene and is then normalized by its expression in a control specimen (cells only).

Table 1. Description of the primers

| Gene                 | Primers foward/reverse                                     | T.M. (°C)    | PB | Ref. Fast Pubmed |
|----------------------|--|--------------|----|------------------|
| Alkaline phosphatase | F:CCGTGGCAACTCTATCTTTGG<br>R: GCCATACAGGATGGCAGTGA         | 55.8<br>57.2 | 21 | NM_000478.4      |
| Osteocalcin          | F: AAGAGACCCAGGCGCTACCT<br>R: AACTCGTCACAGTCCCGGATTG       | 60.6<br>57.1 | 21 | NM_199173        |
| Osteopontin          | F: AGACACATATGATGGCCGAG<br>R: GGCCTTGTATGCACCATTCAA        | 54.4<br>55.9 | 21 | NM_1251830       |
| Collagen T1          | F: CCCTGGAAAGAATGGAGATGAT<br>R: ACTGAAACCTCTGTGTCCCTTCA    | 54.4<br>58.0 | 23 | NM_000088.3      |
| Beta Actin           | F: ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA<br>R: TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA | 60.3<br>57,1 | 24 | NM_001101        |
| Runx2                | F: AGCAAGGTTCAACGATCTGAGAT<br>R: TTTGTGAAGACGGTTATGGTCAA   | 56.3<br>54.6 | 23 | NM_004348        |

T.M. – melting temperatures; Pb – the size of the amplified and reference

## 2.8 Statistical analysis

Data were submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's test, which was used for multiple comparisons. GraphPad Prism program (version 5.01) (San Diego, CA, USA) was used and a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Scaffolds characterization

The electrospinning process is the production of fibrous scaffolds that act as supports for cell adhesion and proliferation, for this to occur, the formation of fibers with proper morphology and distribution is required [23].

From the SEM micrographs (Figure 1), it can be observed the presence of ultrathin fibers, randomly arranged, interconnected and uniform in all scaffolds, indicating an effective three-dimensional architecture as reported in literature, where



the arrangement of polymer fibers influence as a determining factor in the degradation rate, inducing cell growth [24].

The scaffolds groups nHAp incorporation it also generated narrower distributions of the fibers in relation to PBAT group, which may be attributed to the increase in the electrical conductivity and consequent increase in the neat charge density in the jet due to the presence of nHAp. The increase in charge density can lead to more stable electrospinning jets and consequent more homogeneous and uniform electrospun fibers [6,25].

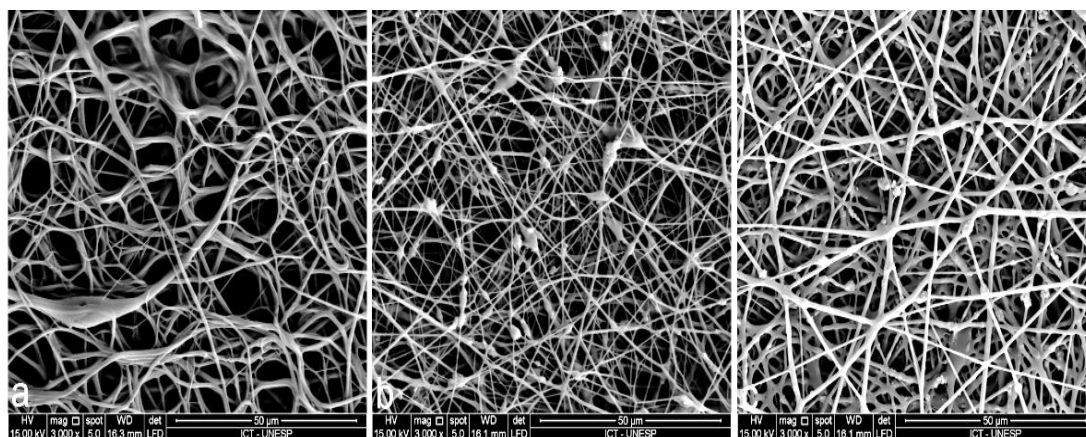


Fig. 1 - FE-SEM micrographs of scaffolds. (a) neat PBAT; (b) PBAT/3%nHAp; (c) PBAT/5%nHAp.

### 3.2 Cell adhesion and proliferation

Surface topography features and composition of biomaterials play a crucial role in cellular response, the initial cell-scaffold interaction influence on the migration, adhesion, proliferation, cell differentiation with subsequent mineralization of the extracellular matrix [26].

Adherence was assessed with 1 day of cell culture, even though there was no significant difference between groups ( $p > 0.05$ ), we observed higher average cell adhesion in scaffolds groups compared to the control group (48.75) < PABT (63.75) < PABT/3%nHAp (71.25) < PABT/5%nHAp (82.50).

Cell proliferation was evaluated at 3, 7, 14 and 21 days of cell culture and showed a significantly increase in cell number over time in all groups. Scaffolds groups compared to the control group showed significantly higher proliferation in periods of 3 and 7 days ( $p < 0.001$ ). At 14 and 21 days of culture, there was no significant difference between control group and PABT ( $p > 0.05$ ), however, statistically significant difference

was found between control group and PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp groups ( $p < 0.001$ ). When the proliferation was evaluated among scaffolds groups, no significant difference between PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp was found ( $p > 0.05$ ) in any of the periods. On the other hand, there was significant difference between PABT, PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp groups at 7, 14 and 21 days ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ) respectively, data represented in Figure 2. These results show the positive influence of nHAp in promoting cell proliferation, as reported in a previous study [27], in which the authors had higher proliferation in the composite polyetheretherketone/nanohydroxyapatite (PEEK/nHA) compared to pure PEEK, using MG63 cells. Although no statistical significant difference was observed between PABT group and control, the PABT scaffold had a higher proliferation rate, corroborating other studies that evaluated the proliferation in scaffolds of nanofibers produced by electrospinning [28,29]. Thus, we suggest that cell proliferation was positively affected by the composition and topography of the scaffold, since they showed a higher number of cells when compared to control group.

Cell adhesion and proliferation were also analyzed by FE-SEM at 1 and 7 days of cell culture. Figure 3 (a, b and c) shows that MG63 cells were able to adhere to the scaffolds with 1 day of cell culture, exhibiting cytoplasmic extensions and normal cell morphology. At 7 days of direct contact with the scaffolds, adhered cells were able to proliferate and spread, occupying 100% of their surface, as shown in Figure 3 (a', b' and c'). In these images, typical characteristics of cytotoxic cellular changes, such as picnotic nuclei, fragmented cytoplasm and/or with granulation were not observed in any scaffold. Best cell adhesion provides high cell density that positively affects osteoblasts proliferation. As these cells are adherent ones, a good fixation on the scaffold surface is essential for viability and subsequent cell proliferation [30]. Thus, our results indicate that the scaffolds were able to promote cell adhesion and proliferation without cytotoxicity evidence, corroborating our quantitative measurements of cell proliferation and viability. Similar results were obtained in studies evaluating cell adhesion in PABT scaffold for tissue engineering [6,13,31].

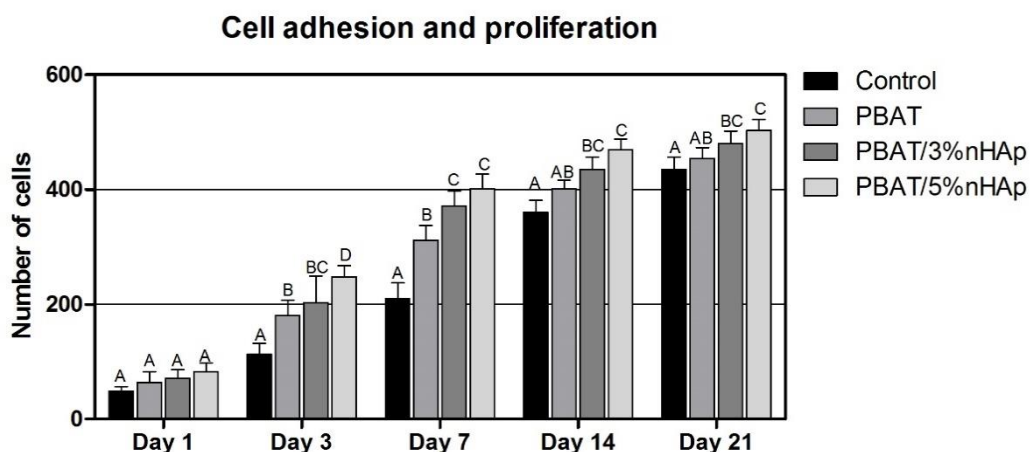


Fig. 2 – Cell adhesion and proliferation at 1, 3, 7, 14 and 21 days of cellular culture, data were expressed as total number of cells. All values were reported as mean  $\pm$  SD (n=5). Different letters show significant differences for  $p < 0.05$ . (ANOVA, post-test Tukey).

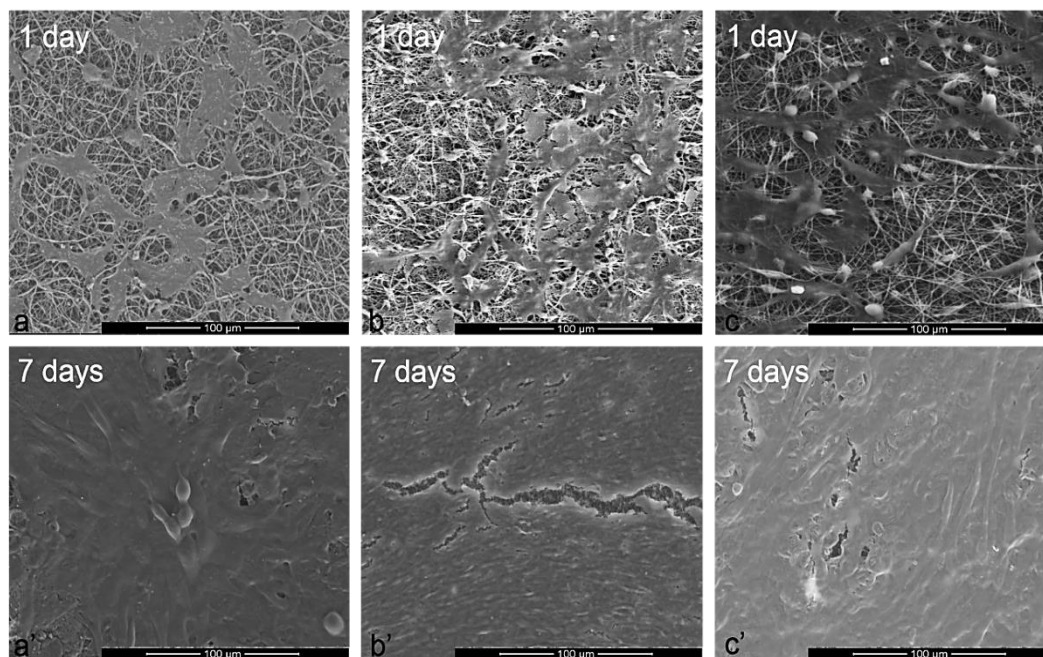


Fig. 3 - FE-SEM micrographs of MG63 cells cultivated on *scaffolds* of neat PBAT and PBAT/nHAp composites with different contents of nHAp at 1 and 7 days of incubation. (a, a') neat PBAT; (b, b') PBAT/3%nHAp; (c, c') PBAT/5%nHAp.

### 3.3 Cell cytotoxicity

For a biomaterial to be considered suitable for use, it must show excellent biocompatibility and no cytotoxicity, which can be assessed by MTT assay, based on cell viability: only viable cells with active mitochondria can degrade the MTT salt resulting in violet-blue staining formazan crystals. The optical density reading of the

formazan crystals is correlated with the number of viable cells on the scaffolds [20].

MG63 cell cytotoxicity on all scaffolds and polystyrene (control group) was assayed at 1, 3 and 7 days of cell culture. As shown in Figure 4, all groups showed an increase in cell viability over time (1 day < 3 days < 7 days), with statistically significant differences ( $p < 0.001$ ). On day 1, no significant difference among PABT, PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp was found ( $p > 0.05$ ). However, they showed statistically significant difference in the increase of cell viability when compared to the control group ( $p < 0.001$ ). At 3 and 7 days of culture, PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp showed significantly higher cell viability compared to control groups ( $p < 0.001$ ) and PABT ( $p < 0.001$ ) and, when compared between themselves, PABT/5%nHAp showed better results ( $p < 0.001$ ).

The results show that the increase in cell viability was proportional to the culture period and that the scaffolds groups always showed better results compared to the control group, showing once again the influence of topography with high adhesion area of the biomaterial in the cellular response. PABT group/5%nHAp had the best results among the scaffolds groups, indicating that the presence of nHAp 5%, a calcium phosphate bioactive ceramics, acted positively on cellular activity due to the chemical and crystallographic similarity to the natural apatite of bone tissue [32-34]. On the basis of the evidence currently available, it seems fair to suggest that the scaffolds of PABT and PABT/nHAp did not induce cytotoxic effects in MG63 cells during the incubation period, with biosafety for possible biomedical use [13,31].

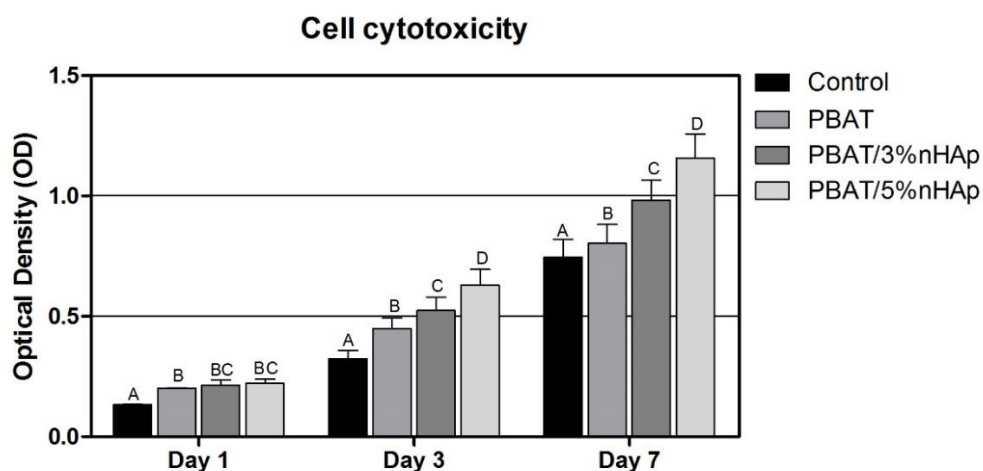


Fig. 4 – Cell cytotoxicity (MTT assay) at 1, 3 and 7 days of cellular culture, data were expressed as optical density (OD) at 570 nm. All values were reported as mean  $\pm$  SD ( $n=5$ ). Different letters show significant differences for  $p < 0.05$ . (ANOVA, post-test Tukey).

### 3.4 Alizarin red

Staining with alizarin red is considered an important tool in osteogenesis because it is an indicator of calcium by mature osteoblastic cells with subsequent mineralization of the extracellular matrix, showing *in vitro* influence of scaffolds in the formation of nodules [35].

The formation of mineralized nodules was observed by microscopy in all groups at 14 days, as well as extensive areas stained with alizarin red, indicating the presence of calcium. The control group had lower formation of nodules when compared to the other groups (Figure 5). Quantification of alizarin red dye after extraction was found in highest concentration in PABT groups with nHAp incorporation when compared to the control group ( $p < 0.001$ ) and PABT ( $p < 0.001$ ) group. Even though there is no statistically significant difference between the groups PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp ( $p = 0.5304$ ), the group with concentration 5% showed the highest dye absorption average (Figure 6). Higher calcium concentrations were found in the scaffolds groups compared to the control group, indicating that the scaffold architecture, similar to the extracellular matrix, induced higher calcium deposition with subsequent mineralization. Groups with nHAp incorporation, independent of the concentration, showed better results compared to PABT and control groups, which corroborate their bioactive properties as reported in previous studies [34-36], which concluded that the synthetic HA incorporated into the matrix polymer has osteoinductive potential, promotes proliferation and differentiation, inducing *in vitro* bone mineralization. Our results indicate PBAT and PABT/nHAp scaffolds as suitable substrates for bone regeneration.



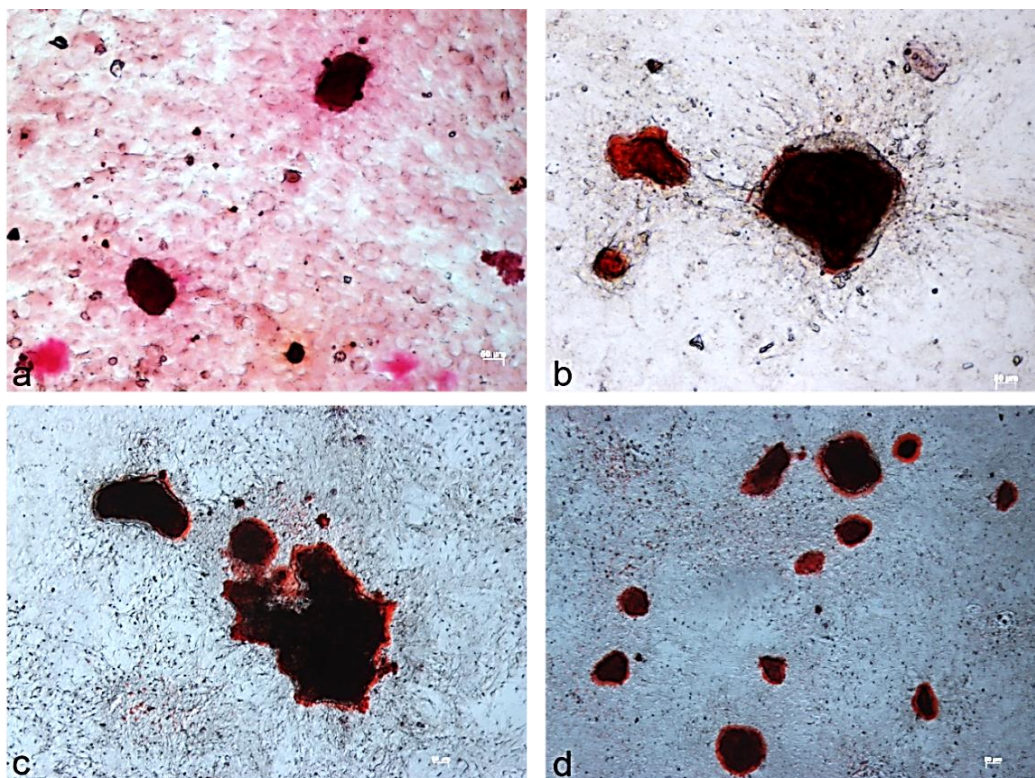


Fig. 5 - Alizarin red staining of mineralized nodule formation *in vitro* at 14 days. a) Control; (b) neat PBAT; (c) PBAT/3%nHAp; (d) PBAT/5%nHAp. Bar a-d: 50 µm.

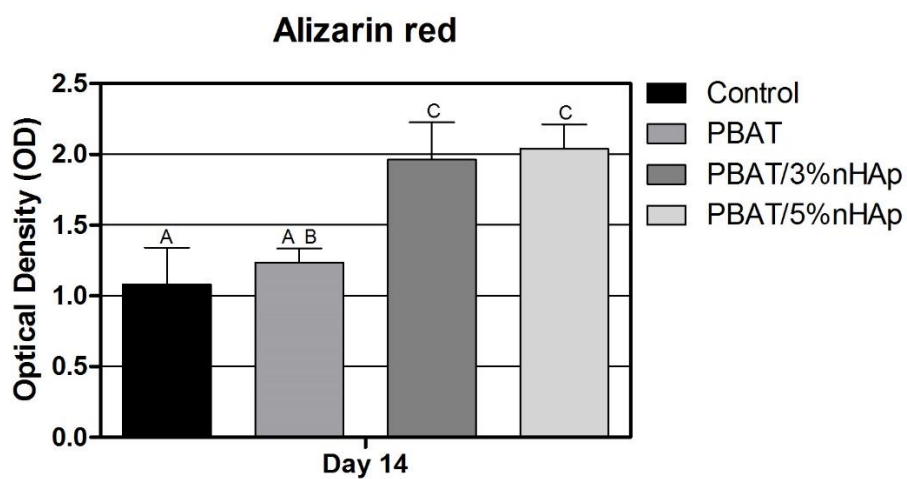


Fig. 6 – Alizarin red at 14 days of cellular culture, data were expressed as optical density (OD) at 405 nm. All values were reported as mean  $\pm$  SD (n=5). Different letters show significant differences for  $p < 0.05$ . (ANOVA, post-test Tukey).

### 3.5 Gene expression analysis by qRT-PCR

The expression of genes and proteins involved in osteogenesis are important parameters to demonstrate *in vitro* osteoblast phenotype regarding the biomaterial it has been exposed to [37]. *In vitro* bone formation involves the initial synthesis of collagen matrix, subsequently mineralized by proteins secreted by mature osteoblasts [38,39]. For the analysis of gene expression of this study, genes involved in osteogenesis were selected. All groups were subjected to quantitative PCR assay in real-time (qRT-PCR) for 3 reference genes,  $\beta$ -actin, GAPDH and 18s.  $\beta$ -actin was chosen to be the reference gene because it presents greater stability during the experimental conditions and it was used to normalize all the results.

Initially, *in vitro* culture of osteoblasts shows an intense proliferation with expression of genes regulating cell cycle followed by differentiation with phenotypic expression of genes such as ALP and Runx2 [40]. ALP is a marker of osteogenic differentiation, the increase of its expression occurs in mature osteoblasts and concomitantly decreases with the beginning of mineralized matrix deposition [40]. Runx2 is a specific marker of osteoblastic differentiation and it exhibits high expression, specially in the early stage of differentiation [39,41]. In this study, ALP expression was initially assessed at 7 days, and all scaffold groups showed increased ALP expression regarding the control group ( $p < 0.001$ ), suggesting that the cells on three-dimensional surface are at a more advanced stage of development than the cells on the smooth surface of polystyrene, 24-well plate bottom. However, among the scaffolds groups, there was significant difference only between the group PABT and the groups PABT/3%nHAp ( $p < 0.001$ ) and PABT/5%nHAp ( $p < 0.05$ ). At 14 days, there was a decrease of ALP expression in the experimental groups, and even with no statistically significant difference between them, the groups PABT and PABT/5%nHAp showed higher expression of ALP than the control group. Decreased ALP expression at day 14 was probably due to increased mineralization proteins and mineralized matrix deposition as suggested by Shao et al. [33]. These data are supported by our qualitative and quantitative assays of alizarin red, with formation of mineralized nodules at 14 days of cell culture. At 21 days of cell culture, there was an increase of ALP expression compared to the period of 14 days, except for PABT/5%nHAp group. PBT and PBT/3%nHAp showed no significant difference in the expression of ALP

( $p > 0.05$ ), but had higher expression than the control group ( $p < 0.001$ ). PABT/5%nHAp presented lower ALP expression towards PABT and PABT/3%nHAp groups ( $p < 0.001$ ), but there was no significant difference in the expression regarding the control group ( $p > 0.05$ ) (Figure 7A). Similar results were obtained in previous studies of three-dimensional scaffolds [33,39], where ALP activity was higher at 7 days with subsequent reduction due to the beginning of extracellular matrix mineralization. The slight ALP increase at 21 days corroborates with Runx2 expression in the same period, and may be related to the renewal of the cell cycle [42].

Runx2 expression was decreased at 7 days of cell culture in the scaffolds groups, regarding other periods and the control group ( $p < 0.001$ ). Despite Runx2 increase at 14 days expression, there was no significant difference in expression between the PABT and PABT/3%nHAp compared to the control group ( $p > 0.05$ ), but when compared, PABT/3%nHAp showed higher expression of Runx2 than PABT group ( $p < 0.05$ ). Although there was increase in the expression of PABT/5%nHAp group in the period from 7 to 14 days, this group showed significantly lower expression of Runx2 compared to the other groups ( $p < 0.001$ ). However, at 21 days PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp showed significantly greater Runx2 expression compared to control and PABT groups ( $p < 0.001$ ) and, compared, PABT/5%nHAp presented higher expression than PABT/3%nHAp ( $p < 0.01$ ), whereas Runx2 expression of PABT group remained similar to the period of 14 days and there was no significant difference regarding the control group ( $p > 0.05$ ) (Figure 7E). Runx2 expression was initially assessed at 7 days of cell culture, but Kim et al. [41] observed increased expression of Runx2, early, at 3 days. We suggest that low Runx2 expression observed in scaffolds groups at 7 days may be justified due to the mature phenotype in this period, confirmed by high cell activity verified by elevated ALP expression in scaffolds groups in the same period. Furthermore, the renewal of the cell cycle may explain the increased late expression of Runx2 at 21 days [42], exhibiting this period, nHAp-incorporated scaffolds groups, higher Runx2 expression indicating the influence nHAp on osteoblastic differentiation.

Approximately 90% of the organic component of the extracellular matrix consists of type I collagen, which provides structural support for the inorganic deposition in the cellular matrix and the remainder is composed of non-collagenous proteins such as osteocalcin, osteopontin and various proteoglycans [43]. Col I



expression was similar at 7 and 14 days of cell culture with higher expression in the control group, compared to the others ( $p > 0.001$ ). However, at 21 days, it was evident the influence of the composition and architecture of the scaffolds in Col I expression, since its expression was higher in scaffolds groups than in the control group ( $p < 0.001$ ) and, when compared, PABT group presented similar expression to PABT/5%nHAp group ( $p > 0.05$ ), with PABT/3%nHAp showing the highest Col I expression compared to the others ( $p < 0.001$ ) (Figure 7B). Different result was reported by Xia et al. [39], who observed initial increase in Col I expression at 7 days with peak expression at 14 days and Ravichandran et al. [44], who obtained increased expression of Col I at 7 days. Although our results show less Col I expression in all scaffolds groups at 7 and 14 days, their three-dimensional architecture played a key role in the mineralized matrix formation at 14 days as found in the alizarin red assay. As reported by [45], subsequent to the mineralization period, the synthesis and expression of type I collagen increases and extracellular matrix becomes organized in the form of minerals for bone regeneration, fact observed in our results at 21 days, with the increase of Col I expression.

The following event to the matrix production is its mineralization. The proteins osteopontin (OPN) and osteocalcin (OC) are bone mineralization markers and also indicate osteoblastic maturation [2,40].

OC expression, specific marker of osteoblasts, at 7 and 14 days, in the scaffolds groups was significantly decreased compared to the control group ( $p < 0.001$ ). However, at 7 days, PABT/3%nHAp exhibited increased expression compared to PABT and PABT/5%nHAp groups ( $p < 0.001$ ), while at 14 days of cell culture, there was no significant difference among scaffolds groups ( $p > 0.05$ ). At 21 days, there was an increase in the OC expression in PABT and PABT/3%nHAp groups, compared to 14 days, however, PABT group showed no difference compared to the control group ( $p > 0.05$ ), and, PABT/3%nHAp exhibited statistically significant increase in OC expression compared to control groups ( $p < 0.001$ ) and PABT ( $p < 0.001$ ). PABT/5%nHAp showed significantly lower expression compared to the other groups ( $p < 0.001$ ) in this period (Figure 7C).

OPN expression at 7 and 21 days of cell culture was not significantly different among groups ( $p > 0.05$ ), however, the scaffolds groups exhibited higher OPN expression than the control group in both periods (Figure 7D). At 14 days, statistically

significant increase in OPN expression of PABT, PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp groups, compared to the control group ( $p < 0.001$ ). PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp groups exhibited increased expression regarding PABT group ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). However, PABT/3%nHAp and PABT/5%nHAp groups showed no significant difference in OPN expression ( $p > 0.05$ ) at 14 days.

The high OPN expression at 14 days, as well as its distribution among the groups, corroborates our findings of mineralized nodules, period that we evaluated and found *in vitro* mineralization. Alves et al. [42] reported expression decrease of some genes at 14 days and correlated it with apoptosis during the cell cycle. The constant expression of OC over time is important to support the mineralization process, similar results were observed [46,47], where OC expression was maintained since the matrix mineralization was initiated with consequent formation of mineralization nodules.

Summary, the study of the expression of genes related to osteogenesis showed a greater efficiency of scaffolds groups compared to the control group, indicating that the three-dimensional architecture induced greater cell adhesion and proliferation, resulting in increased cellular activity with consequent mineralization, as evidenced by the increased levels of ALP expression of genes at 7 days and OPN expression at 14 days. Although the use of HA may be very well established for biomedical use, its use in polymers is not well known, especially in association with PABT. The comparison among the scaffolds groups shows a better performance of scaffolds with incorporation of nHAp, indicating their positive influence on promoting cell adhesion and proliferation. This is due to chemical and structural similarity to the mineral phase of bone tissue and its osteoconductive and osteoinductive properties. Its incorporation into the polymer PABT scaffold probably led to the change of hydrophobicity promoting better adsorption of proteins, influencing the cell-scaffold interactions, resulting in better adherence, greater proliferation and changes in the phenotypic expression of osteoblasts. A major advantage of polymeric matrices is that the improvement of their properties is obtained with small concentrations of nanoparticles. In this study, 3 and 5% nHAp were incorporated to the polymeric PABT solution. Although these concentrations may be low, they were sufficient to promote, *in vitro*, an increase in cell response. Authors [41,42] suggest that lower levels of protein expression may be associated with the cell growth period, i.e., cells may be at

different stages of the cell cycle, this justifies the lowest expression of PABT/5% nHAp scaffold in some periods and studied genes. So, we hypothesized that cells grown on these scaffolds would be at a more advanced stage of development compared to other groups.

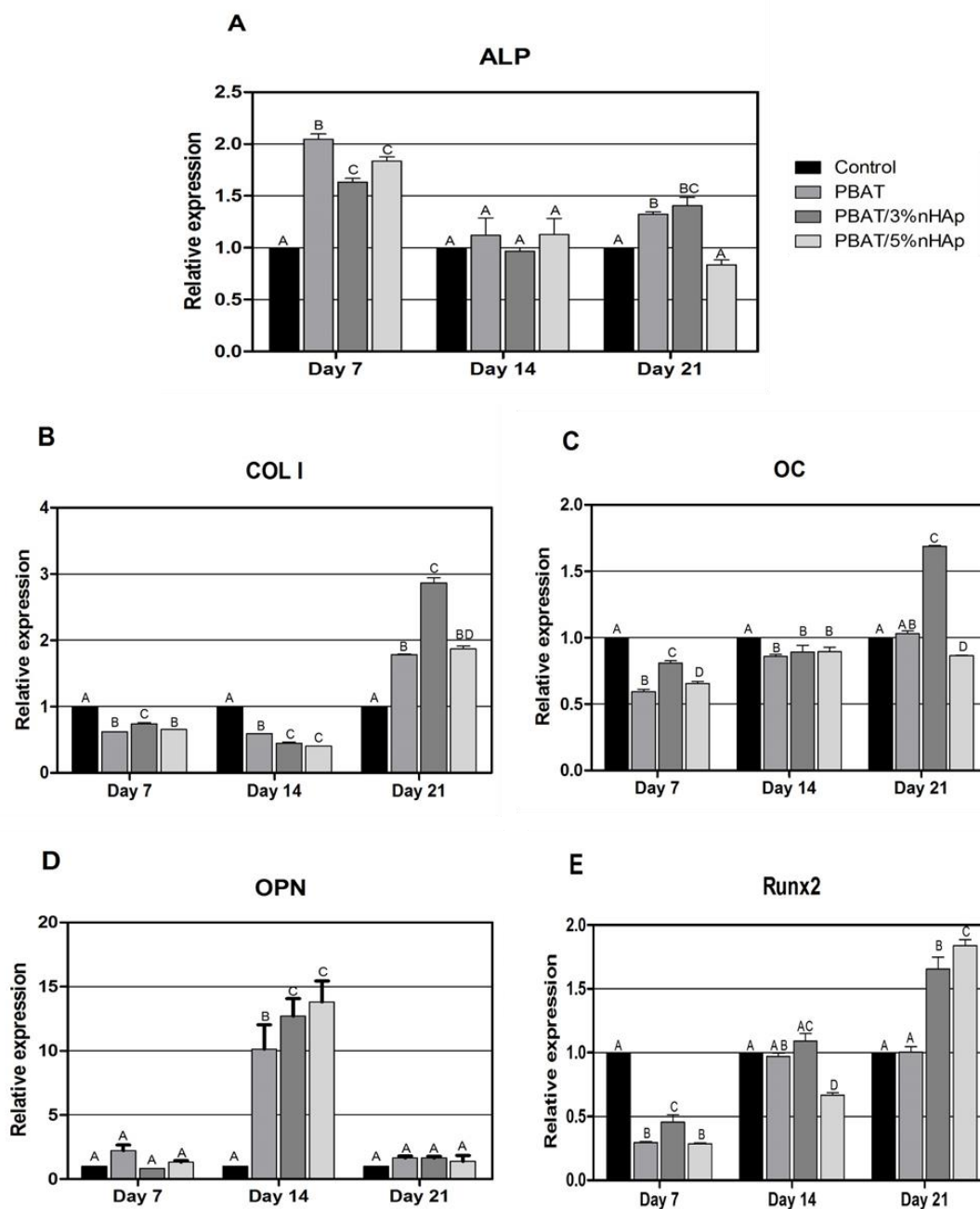


Fig. 7 - qPCR. Relative expression (A) ALP; (B) COL 1; (C) OC; (D) OPN and (E) Runx2 at 7, 14 and 21 days of cell culture. All values were reported as mean  $\pm$  SD (n=5). Different letters show significant differences for  $p < 0.05$ . (ANOVA, post-test Tukey).

## 4 Conclusions

Three-dimensional nanostructured scaffolds of PABT and PABT/nHAp that mimic extracellular matrix characteristics were manufactured successfully by electrospinning. *In vitro* biological assays showed that all scaffolds are viable for biomedical applications, since it was not observed cytotoxic effect and their surface topography, due to the high surface area, positively influence on cell adhesion and proliferation, mineralized matrix forming, as well as in the expression of genes related to cell differentiation and mineralization. Osteoconductive and osteoinductive effects in the nHAp induced better cellular response in scaffolds of PABT with 3 and 5% nHAp compared to single PABT. These results show *in vitro* effectiveness of PABT and PABT/nHAp scaffolds on the cellular bioactivity and gene expression of MG63 cells, presenting great potential for biomedical application.

## Conflict of interest

No conflict of interest

## Acknowledgments

The authors would like to thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 474090/2013-2), São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2011/17877-7, 2011/20345-7 and 2015/01259-3), Brazilian Innovation Agency (FINEP), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, 88887.095044/2015-00) and scholarship CAPES.

## References

- [1] M. Sato, T. Webster, Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Ver Med Devices*. 1 (2004) 105–14.
- [2] R.F. Prado, F.S. Oliveira, R.D. Nascimento, L.M.R Vasconcellos, Y.R. Carvalho, C.A.A. Cairo, Osteoblast response to porous titanium and biomimetic surface: *In vitro* analysis, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 52 (2015) 194-203.

- [3] A.O. Lobo, I.A. Siqueira, M.F. das Neves, F.R. Marciano, E.J. Corat, M.A. Corat, *In vitro* and *in vivo* studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube nanocomposites. *J Mater Sci Mater Med.* 24 (2013) 1723-32.
- [4] R.J. O'Keefe, J. Mao, Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic-an overview, *Tissue Eng. B Rev.* 17 (2011) 389–392.
- [5] A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, *J. Orthop. Surg. Res.* 9 (2014) 9-18.
- [6] B.V.M. Rodrigues, A.S. Silva, G.F.S. Melo, L.M.R. Vasconcellos, F.R. Marciano, A.O. Lobo, Influence of low contents of superhydrophilicMWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 59 (2015) 782-791.
- [7] H. Zhou, J.G. Lawrence, S.B. Bhaduri, Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1999-2016.
- [8] L. Weng, J. Xie, Smart electrospun nanofibers for controlled drug release: recent advances and new perspectives, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 1944–1959.
- [9] S. Kaur, S. Sundarajan, D. Rana, R. Sridhar, R. Gopal, T. Matsuura, S. Ramakrishna, Review: the characterization of electrospun nanofibrous liquid filtration membranes, *J. Mater. Sci.* 49 (2014) 6143–6159.
- [10] W.A. Ribeiro Neto, A.C.C. De Paula, T.M.M. Martins, A.M. Goes, L. Averous, G. Schlatter, R.E. Suman Bretas, Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery, *Polym. Degrad. Stab.* 120 (2015) 61-69.
- [11] I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J.M. Kenny, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review, *Polym. Degrad. Stab.* 11 (2010) 2126-2146.
- [12] M. Okamoto, B. John, Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 1487-1503.
- [13] K. Fukushima, M.H. Wu, S. Bocchini, A. Rasyida, M.C. Yang, PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 32 (2012) 1331-1351.
- [14] R. Bittmann, L. Bousa, M.V. Barral, M.J. González-Rodríguez, Nanoclay reinforced poly (butylene adipate-co-terephthalate) biocomposites for packaging, *Abad Polymer Composites.* 33 (2012) 2022-2028.
- [15] L. Jiang, M.P. Wolcott, J. Zhang, Study of biodegradable polylactide/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends, *Biomacromolecules.* 7 (2006) 199-207.
- [16] I.A.W.B. Siqueira, M.A.F. Corat, B.N. Cavalcanti, W.A.R. Neto, A.A. Martin, R.E.S. Bretas, F.R. Marciano, A.O. Lobo, *In vitro* and *in vivo* studies of novel poly (D, L-lactic acid), superhydrophilic carbon nanotubes, and nanohydroxyapatite scaffolds for bone regeneration, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 9385–9398.
- [17] J. Becker, L. Lu, M.B. Runge, H. Zeng, M.J. Yaszemski, M. Dadsetan, Nanocomposite bone scaffolds based on biodegradable polymers and hydroxyapatite, *J Biomed Mater Res A.* 103 (2014) 2549-2557.
- [18] A. Sonseca, L. Peponi, O. Sahuquillo, J.M. Kenny, E. Gimenez, Electrospinning of biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanofibers: study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability, *Polym. Degrad. Stab.* 97 (2012) 2052-2059.
- [19] C.C. Yu, J.J. Chang, Y.H. Lee, Y.C. Lin, M.H. Wu, M.C. Yang, C.T. Chien, Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering, *Mater. Lett.* 93 (2013) 133-136.

- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*. 65 (1983) 55-63.
- [21] C.A. Gregory, W.G. Gunn, A. Peister, D.J. Prockop, An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction, *Anal Biochem*. 329 (2004) 77-84.
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*. 25 (2001) 402-408.
- [23] S.R. Son, N.T.B. Linh, H.M. Yang, B.T. Lee, *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration, *Sci Technol Adv Mater*. 14 (2013) 1-10.
- [24] S.H. Barbanti, C.A.C Zavaglia, E.A.R Duek, Bioresorbable polymers in tissue engineering, *Polímeros*. 15 (2005) 13-21.
- [25] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning, *Polymer*. 40 (1999) 4585–4592.
- [26] J.R. Venugopal, S. Low, A.T. Choon, A.B. Kumar, S. Ramakrishna, Nanobioengineered electrospun composite nanofibers and osteoblasts for bone regeneration, *Artif Organs*. 32 (2008) 388–397.
- [27] Y. Denga, P. Zhoua, X. Liuc, L. Wangd, X. Xionga, Z. Tangb, J. Weie, S. Weia, Preparation, characterization, cellular response and *in vivo* osseointegration of polyetheretherketone/nano-hydroxyapatite/carbon fiber ternary biocomposite, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 136 (2015) 64–73.
- [28] N.K. Nga, T.T. Hoaia, P.H. Vietb, Biomimetic scaffolds based on hydroxyapatite nanorod/poly (d,l) lactic acid with their corresponding apatite-forming capability and biocompatibility for bone-tissue engineering, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 128 (2015) 506–514.
- [29] Y. Zhang, J.R. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, C.T. Lim, Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 29 (2008) 4314–4322.
- [30] A. Przekora, K. Palka, G. Ginalska, Biomedical potential of chitosan/HA and chitosan/ $\beta$ -1,3-glucan/HA biomaterials as scaffolds for bone regeneration — A comparative study, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 58 (2016) 891–899.
- [31] K. Fukushima, A. Rasyida, M.C. Yang, Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT, *J Polym Res*. (2013) 20:302.
- [32] A. Xu, X. Liuc, X. Gao, F. Denga, Y. Deng, S. Wei, Enhancement of osteogenesis on micro/nano-topographical carbon fiber-reinforced polyetheretherketone–nanohydroxyapatite biocomposite, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 48 (2015) 592-598.
- [33] W. Shao, J. He, F. Sang, B. Ding, L. Chen, S. Cui, K. Li, Q. Han, W. Tanb, Coaxial electrospun aligned tussah silk fibroin nanostructured fiber scaffolds embedded with hydroxyapatite–tussah silk fibroin nanoparticles for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*. 58 (2016) 342–351.
- [34] J.R. Venugopal, V.R.G. Dev, T. Senthilram, D. Sathiskumar, D. Gupta, S. Ramakrishna, Osteoblast mineralization with composite nanofibrous substrate for bone tissue regeneration, *Cell Biol. Int*. 35 (2011) 73–80.
- [35] A. Haider, K.C. Gupta, I.K. Kang, Morphological Effects of HA on the Cell Compatibility of Electrospun HA/PLGA Composite Nanofiber Scaffolds, *BioMed Research International*. (2014) 11.

- [36] M.P. Prabhakaran, J. Venugopal, S. Ramakrishna Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia*. 5 (2009) 2884–2893.
- [37] B.G.R. Jr., Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation, *J Cell Biochem*. 90 (2003) 234-43.
- [38] N.C. Ho, L. Jia, C.C Driscoll, E.M. Gutter, C.A. Francomano, A skeletal gene database, *J Bone Miner Res*. 15 (2000) 2095-122.
- [39] Y. Xia, S.S. Peng, L.Z. Xie, X.J. Lian, X.J. Zhang, H. Cui, T.X. Song, F.M. Zhang, N. Gu, F.Z. Cui, A novel combination of nano-scaffolds with micro-scaffolds to mimic extracellular matrices improve osteogenesis, *Journal of Biomaterials Applications*. 29 (2014) 59-71.
- [40] G.S. Stein, J.B. Lian, Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype, *Endocr Rev*. 14 (1993) 424-42.
- [41] M.J. Kim, C.W. Kim, Y.J. Lim, S.J. Heo, Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells, *J Biomed Mater Res A*. 79 (2006) 1023-1032.
- [42] L.B. Alves, V.C. Mariguela, M.F. Grisi, S.L. Souza, A.B. Novaes Junior, M. Taba Juniro, P.T. Oliveira, D.B. Palioto, Expression of osteoblastic phenotype in periodontal ligament fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel, *J Appl Oral Sci*. 23 (2015) 206-214.
- [43] F.J. Hughes, W. Turner, G. Belibasakis, G. Martuscelli, Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation, *Periodontol 2000*. 41 (2006) 48-72.
- [44] R. Ravichandran, S. Gandhi, D. Sundaram, Hierarchical mesoporous silica nanofibers as multifunctional scaffolds for bone tissue regeneration, *Journal of Biomaterials Science*. (2013) 22:24.
- [45] M.P. Lynch, C. Capparelli, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian, Apoptosis during bone-like tissue development *in vitro*, *J Cell Biochem*. 68 (1998) 31-49.
- [46] J.Y. Choi, B.H. Lee, K.B. Song, R.W. Park, I.S. Kim, K.Y. Sohn, et al, Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells, *J Cell Biochem*. 61 (1996) 609-18.
- [47] M.H. Choi, W.C. Noh, J.W. Park, J.M. Lee, J.Y. Suh, Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*, *J Periodontal Implant Sci*. 41 (2011) 167-75.

## 5 ANÁLISE DO ARTIGO

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais desta pesquisa, foi possível evidenciar a efetividade dos *scaffolds* de PBAT e PBAT com incorporação de nanopartículas de HA, visto que, apresentaram melhor atividade celular quando comparados ao grupo controle. A comparação entre os grupos *scaffolds* evidencia um desempenho melhor dos *scaffolds* com incorporação de nHAp, indicando sua influência positiva sobre a promoção da adesão e proliferação celular independente da concentração utilizada, entretanto, apesar de baixas, as concentrações de nHAp foram suficientes para promover aumento na resposta celular *in vitro*.

Embora do uso da HA seja consagrado para uso biomédico, sua utilização em polímeros ainda é pouco estudada, principalmente em associação ao PBAT, essa associação é interessante por serem materiais de fácil industrialização com grande potencial comercial.

Assim como as demais análises, a expressão dos genes relacionados à osteogênese demonstrou uma maior efetividade dos grupos *scaffolds* em relação ao grupo controle, no entanto, essa efetividade foi evidenciada somente em alguns períodos, por meio de estudos prévios associados aos nossos resultados, aventamos a hipótese da expressão de alguns genes estar relacionada com o ciclo celular, onde seriam necessários os períodos de 3 e 28 dias para comprovarmos essa hipótese.

Dentre as vantagens do uso do polímero, destacam-se o fácil controle de síntese, origem ilimitada, não sofrem degradação mediada por células, além de serem biodegradáveis e biocompatíveis. Contudo, possuem pouca resistência mecânica e baixa bioatividade. A incorporação de nanopartículas de HA à matriz polimérica melhorou a bioatividade do *scaffold* de PBAT, no entanto, ainda é necessário melhorar sua resistência mecânica. Em nosso estudo prévio (Rodrigues et al., 2015), foi evidenciada a melhora na resistência mecânica com a incorporação de nanotubos de carbono. Assim, os próximos passos da pesquisa é a avaliação *in vivo* dos *scaffolds* de PBAT e PBAT/nHAp, visto que, já foi comprovado que não apresentam citotoxicidade e induzem melhor resposta celular, e a avaliação *in vitro* de *scaffolds* de PBAT em associação com nHAp e nanotubos de carbono (CNTs) com posterior



avaliação *in vivo*, objetivando obter *scaffolds* bioativos associados a melhor resistência mecânica.

Apesar de serem necessárias novas pesquisas, este estudo abre a possibilidade para a produção de *scaffolds* bioativos de PBAT em associação com nHA por eletrofiação, assim como, a incorporação de fatores de crescimento a esses *scaffolds* visando maior proliferação celular e indução da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, para futura aplicação em engenharia de tecidos e regeneração óssea.

## 6 REFERÊNCIAS\*

Abedalwafa M, Wang F, Wang L, Li C. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev Adv Mater Sci*. 2013;34:123-40.

Anderson DG, Burdick JA, Langer R. Smart biomaterials. *Science*. 2004 Sep 24;305(5692):1923-4.

Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polym Degrad Stab*. 2010 Nov;95(11):2126-46. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007.

Aryal S, Kim CK, Kim KW, Khil MS, Kim HY. Multi-walled carbon nanotubes/TiO<sub>2</sub> composite nanofiber by electrospinning. *Mater Sci Eng C*. 2008 Jan;28(1):75-9. doi: 10.1016/j.msec.2007.10.002.

Bastarrachea L, Dhawan S, Sablani SS, Mah JH, Kang DH, Zhang J, et al. Biodegradable Poly (butylene adipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and Effectiveness against *Listeria innocua*. *J Food Sci*. 2010 May;75(4):E215-24. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01591.x.

Beck Jr GR. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 2003 Oct;90(2):234-43.

Becker J, Lu L, Runge MB, Zeng H, Yaszemski MJ, Dadsetan M. Nanocomposite bone scaffolds based on biodegradable polymers and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Aug;103(8):2549-57. doi: 10.1002/jbm.a.35391.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Differential effects of fluoride during initiation and progression of mineralization of osteoid nodules formed *in vitro*. *J Bone Miner Res*. 1993 Nov;8(11):1357-63.

Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*. 2010 May-Jun;28(3):325-47. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.01.004.

Bittmann R, Bousa L, Barral MV, Gonzáles-Rodríguez MJ. Nanoclay reinforced poly (butylenes adipate-co-terephthalate) biocomposites for packaging. *Polym Compos*. 2012 Nov;33:2022-8.

Bodine PV, Komm BS. Evidence that conditionally immortalized human osteoblasts express an osteocalcin receptor. *Bone*. 1999 Nov;25(5):535-43.

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Boretos JW, Eden M, Fung YC. Contemporary biomaterials, material and host response, clinical applications, new technology and legal aspects. *J Biomech Eng-T Asme*. 1984 Dec;107(1):232–3.

Braz F, Rahal SC, Rocha NS, Taga E, Biasi F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cir Bras*. 2003 Jan-Feb;18(1):19-24.

Burger C, Hsiao BS, Chu B. Nanofibrous materials and their applications. *Annu Rev Mater Res*. 2006 Aug;36:333–68. doi: 10.1146/annurev.matsci.36.011205.123537.

Casarin SA. Desenvolvimento e caracterização de blendas de compostos empregando polímeros biodegradáveis [dissertação]. São Carlos (SP): Departamento de Engenharia de Materiais, Universidade Federal de São Carlos; 2004.

Castro-Raucci LMS, Oliveira IR, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J*. 2011;22(2):99-104.

Chen JH, Chen CC, Yang MC. Characterization of nanocomposites of poly (butylene adipate-co-terephthalate) blending with organoclay. *J Polym Res*. 2011 May;18(6):2151–9.

Chivrac F, Kadlecová Z, Pollet E, Avérous L. Aromatic copolyester-based nanobiocomposites: elaboration, structural characterization and properties. *J Polym Environ*. 2006 Oct;14(4):393–401.

Chow EK, Zhang XQ, Chen M, Lam R, Robinson E, Huang H, et al. Nanodiamond therapeutic delivery agents mediate enhanced chemoresistant tumor treatment. *Sci Transl Med*. 2011 Mar;3(73):73ra21. doi: 10.1126/scitranslmed.3001713.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996 Aug 1;382(6590):448-52.

Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Mater Today*. 2006 Dec;9(12):26-33. doi:10.1016/S1369-7021(06)71740-0.

Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Mater Today*. 2006 Dec;9(12):26-33. doi:10.1016/S1369-7021(06)71740-0.

Ferreira L, Karp JM, Nobre L, Langer R. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Aug 7;3(2):136-46. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.020.

Fukushima F, Wu MH, Bocchini S, Rasyida A, Yang MC. PBAT based nanocomposites for medical and industrial applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012 Aug 1;32(6):1331-51. doi: 10.1016/j.msec.2012.04.005.

Fukushima K, Rasyida A, Yang MC. Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT. *J Polym Res*. 2013 Nov;20(11):1-12. doi: 10.1007/s10965-013-0302-6.

Goes AM, Carvalho S, Oréface RL, Avérous L, Custódio TA, Pimenta JG, et al. Viabilidade celular de nanofibras de polímeros biodegradáveis e seus nanocompósitos com argila montmorilonita. *Polímeros*. 2012 Feb;22(1):34-40. doi: 10.1590/S0104-14282012005000012.

Gorustovich A, Rosenbusch M, Guglielmotti MB. Characterization of bone around titanium implants and bioactive glass particles: An experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002 Sep-Oct;17(5):644-50.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004 Jun;329(1):77-84.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quím Nova*. 2010;33(6):1352-58. doi: 10.1590/S0100-40422010000600025

Guerra PM. Modificação química do amido de mandioca e blendagem com poliéster biodegradável [dissertação]. Campinas (SP). Faculdade de Engenharia Química. UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas; 2010.

Guerrini LM, Branciforti MC, Bretas RES, Oliveira MP. Eletrofição do poli (álcool vinílico) via solução aquosa. *Polímeros*. 2006 Oct-Dec;16(4):286–93. doi: 10.1590/S0104-14282006000400007.

Haider A, Gupta KC, Kang IK. Morphological effects of HA on the cell compatibility of electrospun HA/PLGA composite nanofiber scaffolds. *Biomed Res Int*. 2014;2014:308306. doi: 10.1155/2014/308306.

Ho NC, Jia L, Driscoll CC, Gutter EM, Francomano CA. A skeletal gene database. *J Bone Miner Res*. 2000 Nov;15(11):2095-122.

Hoang QQ, Sicheri F, Howard A, Yang DS. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*. 2003 Oct 30;425(6961):977-80.

Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol*. 2003 Apr;63(15):2223–53. doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7.

Ingavle GC, Leach JK. Advancements in electrospinning of polymeric nanofibrous scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014 Aug;20(4):277-93. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0276.

Jaoo WC, Lin CH, Hsieh JY, Yeh YH, Liu CY, Yang MC. Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly (Butyleneadipate-co-terephthalate) films. *Polym Adv Technol*. 2010 Aug;21:543–53. doi: 10.1002/pat.1459.

Jeong EH, Yang J, Youk JH. Preparation of polyurethane cationomer nanofiber mats for use in antimicrobial nanofilter applications. *Mater Lett*. 2007 Jul;61(18):3991–4. doi:10.1016/j.matlet.2007.01.003.

Jiang L, Wolcott MP, Zhang J. Study of biodegradable polylactide/poly (butylene adipate-co-terephthalate) blends. *Biomacromolecules*. 2006 Jan;7(1):199-207.

Krauss Juillerat F, Borcard F, Staedler D, Scaletta C, Applegate LA, Comas H, et al. Functionalization of microstructured open-porous bioceramic scaffolds with human fetal bone cells. *Bioconjug Chem*. 2012 Nov 21;23(11):2278-90. doi: 10.1021/bc300407x.

Kalita SJ, Bhardwaj AJ, Bhatt HA. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Mater Sci Eng C*. 2007 Apr;27(3):441-9. doi:10.1016/j.msec.2006.05.018.

Kanjwal MA, Barakat NAM, Sheikh FA, Khil MS, Kim HY. Functionalization of electrospun titanium oxide nanofibers with silver nanoparticles: strongly effective photocatalyst. *Inter J App Cer Technol*. 2010 Jul;7(S1):E54–E63.

Kawachi EY, Bertran CA, Reis RR, Alves OL. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Quím nova*. 2000 Aug;23(4):518-22. doi: 10.1590/S0100-40422000000400015.

Khorshidi S, Solouk A, Mirzadeh H, Mazinani S, Lagaron JM, Sharifi S, et al. A review of key challenges of electrospun scaffolds for tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jan 26. doi: 10.1002/term.1978. [Epub ahead of print].

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002 Feb;(395):81-98.

Li Y, Yang W, Li X, Zhang X, Wang C, Meng X, et al. Improving osteointegration and osteogenesis of three-dimensional porous Ti6Al4V scaffolds by polydopamine-assisted biomimetic hydroxyapatite coating. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Mar 18;7(10):5715-24. doi: 10.1021/acsami.5b00331.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lobo AO, Siqueira IA, das Neves MF, Marciano FR, Corat EJ, Corat MA. *In vitro* and *in vivo* studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube nanocomposites. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Jul;24(7):1723-32. doi: 10.1007/s10856-013-4929-y.

Lucas EF, Soares BG, Monteiro E. Caracterização de polímeros determinação de peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais; 2001.

McKee MD, Nanci A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech*. 1995 May;1(31):44-62.

Mohammadi MS, Bureau MN, Nazhat SN. Poly(lactic acid) (PLA) biomedical foams for tissue engineering. *Biomed Foams Tissue Eng Appl*. 2014:313-34.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1982 Dec 16;65(1-2):55-63.

Navarro M, Michiardi A, Castanõ O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 2008 Oct 6;5(27):1137-58. doi: 10.1098/rsif.2008.0151.

Niinomi M, Nakai M, Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomater*. 2012 Nov;8(11):3888-903. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.037.

Oh S, Oh N, Appleford M, Ong JL. Bioceramics for tissue engineering applications: a review. *Am J Biochem Biotechnol*. 2006;2(2):49-56. doi: 10.3844/ajbbbsp.2006.49.56

Okamoto M, John B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Prog Polym Sci*. 2013 Oct-Nov;38(10-11):1487-503.

O'Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic-an overview. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Dec;17(6):389-92. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0475.

Olsen BR. Morphogenesis: collagen it takes and bone it makes. *Curr Biol*. 1996 Jun 1;6(6):645-7.

Oréface RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomateriais: Fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014 Mar 17;9(1):18. doi: 10.1186/1749-799X-9-18.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990 Jun;143(3):420-30.

Patel S, Kurpinski K, Quigley R., Gao H, Hsiao BS, Poo MM, et al. Bioactive nanofibers: synergistic effects of nanotopography and chemical signaling on cell guidance. *Nano Lett*. 2007 Jul;7(7):2122-8.

Pellicano M, Pachekoski W, Agnelli JAM. Influência da adição de amido de mandioca na biodegradação da blenda polimérica PHBV/Ecoflex®. *Polímeros*. 2009;19(3):212-17. doi: 10.1590/S0104-14282009000300009.

Prado RF, Oliveira FS, Nascimento RD, Vasconcellos LMR, Carvalho YR, Cairo CAA. Osteoblast response to porous titanium and biomimetic surface: *In vitro* analysis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;52:194-203. doi: 10.1016/j.msec.2015.03.028.

Precheur HV. Bone graft materials. *Dent Clin North Am*. 2007 Jul;51(3):729-46, viii.

Ratner BD, Bryant SJ. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng*. 2004;6:41-75.

Ribeiro Neto WA, De Paula ACC, Martins TMM, Goes AM, Averous L, Schlatter G, et al. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym Degrad Stab*. 2015 Oct;120:61-9. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.009.

Robey PG, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W, et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. *J Bone Miner Res*. 1993 Dec;8 Suppl 2:S483-7.

Rodrigues BVM, Silva AS, Santana-Melo GF, Vasconcellos LMR, Marciano FR, Lobo AO. Influence of low contents of superhydrophilicMWCNT on the properties and cell viability of electrospun poly (butylene adipate-co-terephthalate) fibers. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Feb 1;59:782-91. doi: 10.1016/j.msec.2015.10.075.

Rosa AL, Crippa GE, de Oliveira PT, Taba M Jr, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res*. 2009 May;20(5):472-81. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01662.x.

Sato N, Webster TJ. Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices*. 2004 Sep;1(1):105-14.

Siqueira IA, Oliveira CA, Zanin H, Grinet MA, Granato AE, Porcionatto MA. et al. Bioactivity behaviour of nano-hydroxyapatite/freestanding aligned carbon nanotube oxide composite. *J Mater Sci Mater Med*. 2015 Feb;26(2):113. doi: 10.1007/s10856-015-5450-2.

Son SR, Linh NTB, Yang HM, Lee BT. *In vitro* and *in vivo* evaluation of electrospun PCL/PMMA fibrous scaffolds for bone regeneration. *Sci Technol Adv Mater*. 2013 Mar;14(1):1-10. doi: 10.1088/1468-6996/14/1/015009.

Sonseca A, Peponi L, Sahuquillo O, Kenny JM, Gimenez E. Electrospinning of biodegradable polylactide/hydroxyapatite nanofibers: study on the morphology, crystallinity structure and thermal stability. *Polym Degrad Stab*. 2012 Oct;97(10):2052-9. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.009.



Spear RL, Cameron RE. Carbon nanotubes for orthopaedic implants. *Int J Mater Forming*. 2008 Jul;1(2):127-33.

Stachewicz U, Barber AH. Enhanced wetting behavior at electrospun polyamide nanofiber surfaces. *Langmuir*. 2011 Mar 15;27(6):3024-9. doi: 10.1021/la1046645.

Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *Faseb J*. 1990 Oct;4(13):3111-23.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*. 1993 Aug;14(4):424-42.

Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface*. 2009 Jun 6;6 Suppl 3:S311-24. doi: 10.1098/rsif.2008.0448.focus.

Tanaskovic D, Jokic B, Socol G, Popescu A, Mihailescu IN, Petrovic R, et al. Synthesis of functionally graded bioactive glass-apatite multistructures on Ti substrates by pulsed laser deposition. *App Surf Sci*. 2007 Dec;254(4):1279-82.

Vallet-Regí M, Gonzalez-Calbet JM. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog Solid State Ch*. 2010;32(1-2):1-31. doi: 10.1016/j.progsolidstchem.2004.07.001.

Vasconcellos LMR, Oliveira MV, Graça MLA, Vasconcellos LGO, Cairo CAA, Carvalho YRC. Design of dental implants, influence on the osteogenesis and fixation. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 Aug;19(8):2851-7. doi: 10.1007/s10856-008-3421-6.

Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dent Clin North Am*. 2006 Apr;50(2):175-90, vii.

Wang X, Kim YG, Drew C, Ku BC, Kumar J, Samuelson LA. Electrostatic assembly of conjugated polymer thin layers on electrospun nanofibrous membranes for biosensors. *Nano Lett*. 2004 Jan;4(2):331-4. doi: 10.1021/nl034885z.

Wazen RM, Lefebvre LP, Baril E, Nanci A. Initial evaluation of bone ingrowth into a novel porous titanium coating. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul;94(1):64-71. doi: 10.1002/jbm.b.31624.

Weng L, Xie J. Smart electrospun nanofibers for controlled drug release: recent advances and new perspectives. *Curr Pharm Des*. 2015;21(15):1944-59.

Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005 Jan-Feb;11(1-2):1-18.

Xiao Y, Gong T, Zhou S. The functionalization of multi-walled carbon nanotubes by *in situ* deposition of hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2010 Jul;31(19):5182-90. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.012.



Xynos ID, Edgar AJ, BATTERY LDK, HENCH LL, POLAK JM. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J Mater Res.* 2001;55(2):151-7.

Yang F, Qiu Z. Preparation, crystallization, and properties of biodegradable poly (butylene adipate-co-terephthalate)/organomodified montmorillonite nanocomposites. *J Appl Polym Sci.* 2011 Feb;119(3):1426–34. doi: 10.1002/app.32619.

Yang H, Yan X, Ling M, Xiong Z, Ou C, Lu W. *In vitro* corrosion and cytocompatibility properties of nano-whisker hydroxyapatite coating on magnesium alloy for bone tissue engineering applications. *Int J Mol Sci.* 2015 Mar 17;16(3):6113-23. doi: 10.3390/ijms16036113.

Yu CC, Chang JJ, Lee YH, Lin YC, Wu MH, Yang MC, et al. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Mater. Lett.* 2013 Feb;93(15):133-6. doi: 10.1016/j.matlet.2012.11.040.

Zhou H, Lawrence JG, Bhaduri SB. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: a review. *Acta Biomater.* 2012 Jul;8(6):1999-2016. doi: 10.1016/j.actbio.2012.01.031.