



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Fernanda Coelho**

**Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial reparador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-bmp-2**

**Araraquara**

**2018**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Fernanda Coelho**

**Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial reparador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-bmp-2**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses

**Orientador: Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote**

**Araraquara**

**2018**

Coelho, Fernanda

Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial reparador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-BMP-2 / Fernanda Coelho. -- Araraquara: [s.n.], 2018  
99 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote

1. Regeneração óssea 2. Anticorpos monoclonais 3. Toxicidade  
4. Expressão gênica I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036  
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**Fernanda Coelho**

**Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial reparador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-bmp-2**

**Comissão julgadora**

**Dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses**

Presidente e orientador: Prof. Dr. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote

2º Examinador: Prof. Dr. Raquel Mantuanelli Scarel Caminaga

3º Examinador: Prof. Dr. Chaine Pavone

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018

## **DADOS CURRICULARES**

**Fernanda Coelho**

NASCIMENTO: 14/08/1992 - São Carlos- São Paulo

FILIAÇÃO: Augustinho Coelho e Marinês Cavallaro Coelho

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

- 2016- 2018 Mestrado em Odontologia. Área de concentração: Biociências, Biomateriais e Ciências Forenses.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial regenerador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-BMP-2  
Orientador: Ticiano Sidorenko de Oliveira Capote  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 – 2016 Graduação em Farmácia-Bioquímica.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil  
Título: Avaliação do potencial tóxico de lentes de contato à base de Celulose bacteriana com adição de complexos fármaco-ciclodextrinas revestidas por composto híbrido orgânico-inorgânico  
Orientador: Ticiano Sidorenko de Oliveira Capote  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Dedico este trabalho à Deus, por me permitir viver e por me capacitar para realizar  
meus sonhos;

Aos meus pais, Augusto e Marinês, que são minha base, pelo incentivo e esforços que  
fizeram para eu alcançar meus objetivos;

E ao homem, que Deus não poderia ter escolhido melhor para estar ao meu lado, Paulo,  
pela paciência, pelo apoio, pelas inúmeras vezes que não me deixou desanimar e me fez  
encontrar forças para continuar acreditando nos nossos sonhos.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dr. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote, por ter acreditado no potencial dessa pesquisa, pelo apoio e pela confiança depositada em mim para realizá-lo. Por ter se adaptado ao meu modo de ser e trabalhar, por transmitir seus inúmeros conhecimentos e nunca ter me negado um pedido de ajuda. Obrigada pela sua amizade, a qual nunca eu irei esquecer. Você é uma das pessoas responsáveis por eu concluir mais uma etapa da minha vida. Muito obrigada!

Aos colaboradores desse trabalho, Prof. Dr. Sidney José de Lima Ribeiro, Profa. Dra. Alexandra Ivo Medeiros, Profa. Dra. Raquel Mantuanelli Scarel Caminaga, Dr. Mauricio Cavicchioli, e a Dra. Sybele Saska Specian, pelo apoio desde a elaboração do projeto de pesquisa e a execução dos ensaios.

À Profa. Dra. Raquel Mantuanelli Scarel Scaminaga, pelos ensinamentos desde os primeiros anos de graduação até o presente, pela oportunidade de poder aprender um pouco mais nesses últimos meses sobre outros ensaios, e principalmente, pela paciência que teve ao trabalhar com o meu jeito acelerado. Meu sincero muito obrigado por todos esses anos de convívio.

Agradeço em especial ao Mauricio Cavicchioli, que sempre esteve disponível para a confecção das amostras e sempre me transmitiu todo seu conhecimento, me auxiliando em tudo que era possível.

À Profa. Dra. Alexandra Ivo Medeiros que aceitou participar desse projeto e sempre esteve disponível para nos auxiliar nas inúmeras dúvidas que surgiram. Agradeço as suas alunas, Leticia e Ana que sempre muito educadas me auxiliaram e contribuíram para a realização de alguns ensaios.

Agradeço a ajuda da Andreia na realização dos testes de resistência da membrana e pelo conhecimento transmitido.

Agradeço a minha amiga Larissa Mendes, que apesar da distância, nunca me negou uma ajuda e tentou me auxiliar sempre da melhor maneira possível.

À Prof. Dr. Estela Sasso Cerri pelo auxílio durante a utilização do microscópio de fluorescência.

Às minhas amigas de laboratório Sâmia Corbi e Suzane Pigossi, que me transmitiram os seus conhecimentos para a realização do ensaio de expressão gênica e sempre que possível me auxiliaram.

Às integrantes e ex-integrantes do grupo LCCM: Maria, Joissi e Karine, meninas que nunca terei do que reclamar e só terei motivos para agradecer sempre por toda a ajuda concedida.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio concedido (processo: 2016/25926-1) e à CAPES pela bolsa de Mestrado.

*“Prefiram a minha instrução à prata,  
e o conhecimento ao ouro puro,  
pois a sabedoria é mais preciosa do que rubis;  
nada do que vocês possam desejar compara-se a ela.”*

*Provérbios 8:10-1*

Coelho F. Desenvolvimento, avaliação da toxicidade e do potencial reparador ósseo de materiais à base de fibroína ou celulose bacteriana associados à hidroxiapatita e anticorpos anti-bmp-2. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## RESUMO

A engenharia tecidual voltada ao tecido ósseo tem como objetivo proporcionar uma reparação que apresente propriedades físicas e biológicas similares ao osso natural com restabelecimento adequado das suas funções. Neste contexto, materiais aloplásticos baseados em biopolímeros como a fibroína da seda (FS) e celulose bacteriana (CB) têm proporcionado a síntese de excelentes biomateriais para reparação óssea. Esses biopolímeros são biocompatíveis, possuem características mecânicas interessantes, apresentam uma lenta taxa de degradação *in vivo*, além da capacidade de serem modificados quimicamente. Para conferir a estes biopolímeros uma melhor bioatividade com intuito de potencializar a eficácia local da reparação óssea, o objetivo do presente estudo consistiu em sintetizar uma membrana à base de FS e outra à base de CB, sendo cada uma associada à hidroxiapatita e anticorpo anti-proteína morfogenética óssea (anti-BMP-2). Para tanto, estas membranas foram caracterizadas físico-quimicamente e, para análise do potencial destas membranas na reparação óssea, foram realizados ensaios *in vitro* para investigação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, além de expressão gênica desses materiais. As membranas à base de CB obtiveram resultados da caracterização físico-quimicamente mais satisfatórios em relação à FS e os testes seguintes foram realizados apenas com a membrana de CB. A membrana de CB associada à hidroxiapatita não demonstrou citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade para as linhagens CHO-K1 e MC3T3-E1. Estudos de cinética de liberação de anticorpos *in vitro* foram realizados para confirmar a ligação de anti-BMP-2 nas membranas e o perfil de liberação dos anticorpos quando associados a anticorpos secundários conjugados com FITC. Os resultados demonstraram níveis de anticorpos detectados por até 14 dias e uma redução gradativa com o passar dos dias, reduzindo aproximadamente 70% em 7 dias e 90% em 14 dias. Referente à análise de expressão gênica dos 6 genes candidatos investigados, todos apresentaram aumento de expressão gênica, sendo os genes *ALPL*, *RUNX2* e *TNFRS11B* nos primeiros dias de contato com

a membrana e os genes *SPP1*, *BGLAP* e *VEGF* após um período de contato maior comparado ao grupo de interesse. Estudos de mineralização óssea e a atividade de fosfatase alcalina demonstraram que os grupos que apresentavam a proteína BMP-2 obtiveram uma maior resposta quando comparada ao grupo controle. Em conclusão, a membrana CB-HA-antiBMP-2 obteve resistência mecânica necessária para agir como material de preenchimento ósseo; é hidrofílica, permitindo a adesão e proliferação celular e não apresentou potencial tóxico. A adsorção dos anticorpos nas membranas foi confirmada; houve um aumento da expressão dos genes envolvidos na reparação óssea in vitro em células MC3T3-E1; houve aumento da formação de nódulos minerais e da atividade de *ALP*.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Anticorpos monoclonais. Toxicidade. Expressão gênica.

Coelho F. Development, evaluation of toxicity and bone repair potential of materials made of fibroin or bacterial cellulose associated with hydroxyapatite and anti-bmp-2 antibodies.[dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **ABSTRACT**

Tissue engineering related to the bone tissue aims to provide a repair that presents similar physical and biological properties to the natural bone with adequate restoration of its functions. In this context, alloplastic materials based on biopolymers such as silk fibroin (SF) and bacterial cellulose (BC) have provided the synthesis of excellent biomaterials for bone repair. These biopolymers are biocompatible, have interesting mechanical characteristics, have a slow rate of degradation in vivo, and the ability to be chemically modified. In order to give these biopolymers better bioactivity to potentiate the local effectiveness for bone repair, the aim of the present study was to synthesize a SF-based and BC-based membrane, each of them was associated with hydroxyapatite and antibody anti-bone morphogenetic protein (anti-BMP-2). The membranes with immobilized anti-BMP-2 are expected to be effective in capturing endogenous BMP-2, conferring a different therapeutic approach and potential use for bone tissue engineering. For this purpose, these membranes were physico-chemically characterized and, in order to analyze the potential of these membranes in bone repair, in vitro assays were performed to investigate cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity and gene expression of these materials. The BC-based membranes obtained physically-chemically characteristics more satisfactory than the SF, and the next tests were performed only on the BC membrane. The BC membrane associated with hydroxyapatite did not demonstrate cytotoxicity genotoxicity and mutagenicity for CHO-K1 and MC3T3-E1. In vitro antibody kinetics studies were performed to confirm the binding of anti-BMP-2 to membranes and the antibody release profile when associated with FITC-conjugated secondary antibodies. The results demonstrated antibody levels detected for up to 14 days, and a gradual reduction over the course of days, reducing approximately 70% at 7 days and 90% at 14 days. Regarding the gene expression analysis of the 6 candidate genes investigated, all presented increased gene

expression, with the *ALPL*, *RUNX2* and *TNFRS11B* genes in the first days of contact with the membrane, and the *SPPI*, *BGLAP* and *VEGF* genes after a superior contact period compared to the interest group. Studies of bone mineralization and alkaline phosphatase activity demonstrated that the groups that presented the BMP-2 protein obtained a greater response when compared to the control group. In conclusion, the BC-HA-anti-BMP-2 membrane presented the necessary mechanical resistance to act as bone filling materials; is hydrophilic, allowing adhesion and cell proliferation; and did not present toxic potential. The adsorption of the antibodies on the membranes was confirmed; there was an increase of the expression of genes involved in bone repair in vitro in MC3T3-E1 cells; there was increase of the mineral nodule formation and of the ALP activity.

**Key words:** Bone regeneration. Monoclonal antibodies. Toxicity. Gene expression.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cascata de sinalização de BMP-2 na expressão de marcadores osteogênicos.

Figura 2: Esquema de imobilização de anti- BMP-2 em membranas. Demonstração da captura de BMP-2 endógeno e de células células-tronco osteoprogenitoras. 1) O mAb anti-BMP-2 é imobilizado em uma membrana de CB. (2) O mAb captura BMP-2 endógeno do microambiente. (3) O BMP-2 capturado por mAb atrai e liga em seu receptor celular específico células osteoprogenitoras, promovendo sua diferenciação osteogênica.

Figura 3: Produção da membrana de celulose bacteriana. A- Inoculação do meio de cultura. B- Manta de CB produzida.

Figura 4: Produção da FS de acordo com o protocolo de Rockwood et al. (2011).

Figura 5: Representação dos níveis de interação gota-superfície de acordo com o ângulo de contato.

Figura 6: Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT. Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 7: CLAE da solução restante da extração do casulo com  $\text{NaCO}_3$ .

Figura 8: CLAE da solução viscosa final obtida a partir da solução de LiBr.

Figura 9: CLAE solução viscosa final obtida a partir da solução de  $\text{CaCl}_2$ .

Figura 10: Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras CB e CB-HA.

Figura 11: Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras FS e FS-HA.

Figura 12: Micrografia de MEV das membranas de CB e CB-HA: A. Superfície da CB, aumento 10x; B. Superfície da CB, aumento 50x; C. Superfície da CB-HA, aumento 10x; D, superfície da CB-HA, aumento 50x.

Figura 13: Micrografia de MEV das membranas de FS e FS-HA. A. Superfície da FS, aumento 10x; B. Superfície da FS, aumento 50x; C. Superfície da FS-HA, aumento 10x; D. Superfície da FS-HA, aumento 50x.

Figura 14: Espectro de EDS para as amostras CB-HA (A) e FS-HA (B).

Figura 15 Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT. Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 16: Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 17: Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 18: Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio de Tail Moment. Barras indicam o erro padrão. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 19: Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT. Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 20: Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica. Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN (\*\*\*) ( $p < 0,0001$ ) (\*\* =  $p < 0,001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 21: Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 22: Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa. Colunas indicam o valor médio de Tail Moment. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Figura 23: Caracterização do perfil de adsorção *in vitro* de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nas membranas de CB. (A) Análise microscópica de fluorescência demonstrando a ligação do mAb anti-BMP-2 na membrana CB-HA detectado por

anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias). A primeira linha mostra as membranas CB-HA com anticorpos primários e secundários. A segunda linha mostra as membranas CB-HA apenas com anticorpos secundários. A última coluna mostra o Controle (CB-HA) sem nenhum tipo de anticorpo ligado. (B) Análise microscópica de fluorescência na membrana CB-HA inoculadas apenas por anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias). O dia 1 representa a detecção de ligação de anti-BMP-2mAb imediatamente após a imobilização do mAb na membrana CB-HA, confirmando que o mAb de camundongo é mantido em todos por até duas semanas *in vitro*.

Figura 24: Caracterização do perfil de adsorção *in vitro* de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nas membranas de CB-HA. Análise quantitativa de imunofluorescência de membranas com mAb anti-BMP-2 imobilizado do dia 1° ao dia 14° após a adsorção.

Figura 25: Análise quantitativa de RT-qPCR dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 14 e 21 após cultivo celular dos genes *SPPI* (A), *ALPL* (B), *TNFRSF11B* (C), *RUNX2* (D), *BGLAP* (E), e *VEGF* (F). Barras indicam o nível médio de expressão gênica ( $2^{-\Delta C_t}$ ) +/- erro padrão. ANOVA two-way seguido do Teste de Bonferroni. \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,1$ , \* =  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle de cada período.

Figura 26: Análise macroscópica e microscópica dos nódulos minerais por Vermelho de Alizarina dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 10 e 14 dias após cultivo celular.

Figura 27: Análise quantitativa dos nódulos minerais por Vermelho de Alizarina dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 10 e 14 dias, por leitura de absorbância a 405 nm. Barras indicam o maior potencial osteogênico de culturas de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Figura 28: Análise quantitativa da atividade de ALP dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 10 e 14 dias após cultivo celular em 595 nm. Barras indicam a atividade de ALP de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Figura 29: Análise quantitativa da produção de IL-6 dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Barras indicam a quantidade detectada de IL-6 de acordo

com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Figura 30: Análise quantitativa da produção de TGF- $\beta$  dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Barras indicam a quantidade detectada de TGF- $\beta$  de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Materiais desenvolvidos à base de FS ou CB, associados à HA e anticorpo anti-BMP-2.

Tabela 2: Materiais testados durante extração da fibroína.

Tabela 3: Ângulos de contato e condições de hidrofiliicidade.

Tabela 4: Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos. Fase da apatita, fórmula química e razão molar Ca/P.

Tabela 5: Espessura das membranas (média  $\pm$  desvio padrão; n=5).

Tabela 6: Propriedades mecânicas das membranas.

Tabela 7: Valores mensurados para o ângulo de contato para as amostras CB, CB+HA, FS, FS+HA, CB+AC, CB+HA+AC, FS+AC, FS+HA+AC.

Tabela 8: Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN), Frequência de Micronúcleos (FMN), Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e Brotos obtidos de cada tratamento com os materiais e controles. Valores apresentados da média e erro padrão (EP). \*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,0001$ , em relação à CN. Dunnett.

Tabela 9: Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN), Frequência de Micronúcleos (FMN), Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e Brotos obtidos de cada tratamento com os materiais e controles. Valores apresentados da média e erro padrão (EP). A letra <sup>a</sup> indica diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ( $p < 0,0001$ ), Dunnett. <sup>b</sup> =  $p < 0,0001$ , Tukey.

Tabela 10. Materiais avaliados no ensaio de Expressão Gênica

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

*ALP- Alkaline Phosphatase (Fosfatase Alcalina)*

AMOR- Antibody Mediated Osseous Regeneration

Ap- Alongamento Durante a Perfuração

BGLAP- *Osteocalcina*

BMPs- Proteínas Morfogenéticas Ósseas

CB- antiBMP-2- Celulose Bacteriana + anticorpo anti- BMP-2

CB- Celulose bacteriana

CB-HA- Celulose Bacteriana + Hidroxiapatita

CB-HA-antiBMP-2- Celulose Bacteriana + Hidroxiapatita + anticorpo anti- BMP-2

CLAE- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CN- Controle negativo

CP- Controle Positivo

EDS- Espectroscopia por Dispersão de Energia e Raio X

ELISA- Ensaio Imunoenzimático

Ep- Energia na Perfuração por Unidade de Volume

FBMN- Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleos

FDA- Food and Drug Administration

FITC- Isotiocianata de fluoresceína

FMN- Frequência total de Micronúcleos

FS- Fibroína da seda

FS-antiBMP-2- Fibroína + anticorpo anti- BMP-2

FS-HÁ- Fibroína + Hidroxiapatita

FS-HA-antiBMP-2- Fibroína + Hidroxiapatita + anticorpo anti- BMP-2

FTIR- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

HA- Hidroxiapatita

IDN- Índice de Divisão Nuclear

*IL-6- Interleucina -6*

*MAPK- Mitogen Activated Protein Kinases*

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

PCR- Reação em cadeia da Polimerase

PN- Pontes Nucleoplasmáticas

Rp- Resistência à Rerfuração

RT-qPCR- Reação de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo real.

SBF- Simulated Body Fluid

SFB- Soro Fetal Bovino

*SPP1- Osteopontina*

TA- Temperatura Ambiente

*TGF- $\beta$ - Ttransformation Growth Factor –  $\beta$*

*TNFRSF11B -Osteoprotegerina*

*VEGF- Fator de Crescimento Endotelial*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>1.1 Biopolímeros Fibroína da Seda (FS) e Celulose Bacteriana (CB)</b>	<b>22</b>
<b>1.2 Hidroxiapatita</b>	<b>23</b>
<b>1.3 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Antibody Mediated Osseous Regeneration (AMOR)</b>	<b>27</b>
<b>1.5 Investigação de Citotoxicidade, Cenotoxicidade e Mutagenicidade</b>	<b>28</b>
<b>1.6 Investigação da Expressão Gênica</b>	<b>30</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais</b>	<b>32</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b>	<b>32</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Preparação e Caracterização das Membranas de CB e de FS</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Ensaios in Vitro para Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade das Membranas</b>	<b>41</b>
<b>3.3 Imobilização do Anticorpo Monoclonal anti-bmp-2 nas Membranas de Celulose Bacteriana e Verificação da Cinética de Adsorção do Anticorpo in Vitro</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Expressão Gênica</b>	<b>47</b>
<b>3.5 Detecção da Formação de Nódulos Minerais por Coloração com Vermelho de Alizarina</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Atividade da ALP</b>	<b>49</b>
<b>3.7 Quantificação da Produção de IL-6 e TGF-<math>\beta</math> por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</b>	<b>49</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>50</b>

<b>4.1 Avaliação da Toxicidade da Fibroína: Ensaio de Citotoxicidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para Confirmação da Separação e Eliminação da Proteína Serecina</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Caracterização das Membranas</b>	<b>52</b>
<b>4.3 Ensaio in Vitro para Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Estudos de Adsorção de Anticorpos in Vitro</b>	<b>69</b>
<b>4.5 Expressão Gênica</b>	<b>71</b>
<b>4.6 Detecção da Formação de Nódulos Minerais por Coloração com Vermelho de Alizarina</b>	<b>76</b>
<b>4.7 Atividade da Proteína Fosfatase Alcalina (ALP)</b>	<b>79</b>
<b>4.8 Quantificação da Produção de IL-6 e TGF-<math>\beta</math> por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)</b>	<b>80</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>93</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo que possui uma matriz extracelular mineralizada com determinado grau de rigidez e elasticidade, conferindo ao corpo a função de suporte<sup>1</sup>. A produção, manutenção e reabsorção deste tecido resultam da interação de três tipos celulares: os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A matriz óssea tem dois componentes: uma parte mineral constituída por hidroxiapatita que contribui com 65-70%, e uma parte orgânica, composta de glicoproteínas, proteoglicanos, sialoproteínas, proteínas ósseas, que compõem entre 25-30% da matriz total<sup>2</sup>.

A regeneração óssea é um processo altamente eficiente e fortemente regulado que envolve todos os componentes do tecido ósseo<sup>3</sup>. Esse processo envolve múltiplos eventos que incluem a reabsorção do tecido ósseo necrosado e do coágulo subsequente ao trauma. Concomitante a esses eventos, há o desenvolvimento de processo inflamatório que propicia a liberação de fatores de crescimento que auxiliam na diferenciação celular e, conseqüentemente, na formação do tecido ósseo<sup>4</sup>.

O processo de regeneração óssea transcorre sem complicações na maioria dos casos (90 a 95%)<sup>5</sup>. No entanto, defeitos ósseos prolongados após trauma ou ressecção de câncer ou fraturas não unidas podem exigir tratamento mais sofisticado. Nestes casos, procedimentos de enxerto ósseo, transporte ósseo, distração osteogênica ou biomateriais são aplicados para reconstrução óssea<sup>3</sup>.

O enxerto ósseo é um procedimento cirúrgico comumente realizado para aumentar a regeneração óssea em uma variedade de procedimentos ortopédicos e maxilofaciais<sup>6</sup>, sendo o osso autólogo considerado o material "padrão-ouro" de enxerto ósseo<sup>4,2,7,6,8</sup>. Isso ocorre porque combina todas as propriedades necessárias para uma regeneração óssea eficiente em um material: osteointegração (proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e outros fatores de crescimento), osteogênese (células osteoprogenitoras) e osteocondução<sup>6</sup>. Contudo, o enxerto autólogo apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de remoção do tecido ósseo de outra região do paciente (sítio doador), o que demanda outra cirurgia, com suas respectivas morbidade e possíveis complicações pós-operatórias (hemorragia, hematoma, infecção e dor crônica) que são comuns da remoção do tecido ósseo para enxerto<sup>3</sup>, as quais aumentam com a quantidade de osso colhido<sup>2</sup>. O aloenxerto, osso retirado do corpo de outra pessoa, poderia ser uma alternativa. No entanto, a taxa de incorporação do aloenxerto é menor do que com o auto-enxerto, além de apresentar possibilidade de transmissão de patógenos<sup>2</sup>.

Em certos contextos clínicos e indicações apropriadas, uma combinação de materiais substitutos ósseos (biomateriais) com células/tecidos vivos, ou uso desses biomateriais sozinhos pode ser adequada<sup>8</sup>.

Sendo assim, um biomaterial ideal para reconstrução óssea deveria possuir as qualidades de um osso autógeno, sem as desvantagens decorrentes da obtenção de tecido ósseo de um sítio doador. É necessário que permita uma boa adesão celular à sua superfície, tenha uma resistência mecânica suficiente para ser usado em locais onde há incidência de carga, não tenha características oncogênicas, seja hemostático, esterilizável, biocompatível, biorreabsorvível, osteocondutor, osteoindutor, estruturalmente semelhante ao osso, fácil de usar e econômico<sup>3,8</sup>.

O número crescente de materiais para enxerto ósseo com origens completamente diferentes está comercialmente disponível para muitas aplicações no corpo humano. São variáveis em sua composição, seu mecanismo de ação e, portanto, suas indicações. Biomateriais são geralmente considerados como uma alternativa altamente relevante para enxerto ósseo em cirurgia dentária, implantodontia e periodontia. Desta forma, uma grande variedade de defeitos ósseos pode ser reparada usando biomateriais<sup>8</sup>.

### **1.1 Biopolímeros Fibroína da Seda (FS) e Celulose Bacteriana (CB)**

Entre os polímeros naturais, a celulose bacteriana (CB) e a fibroína da seda (FS) oferecem inúmeras oportunidades para funcionalização, processamento e integração biológica<sup>9</sup>.

A seda é amplamente conhecida na indústria têxtil por seu brilho e propriedades mecânicas. Sedas são proteínas fibrosas sintetizadas por células epiteliais de glândulas do bicho-da-seda. As fibras de fibroína possuem aproximadamente 10-25 µm e consistem em duas cadeias proteicas: uma cadeia leve (26 kDa) e outra pesada (390 kDa), ligadas por uma simples ligação dissulfeto<sup>10</sup>. Essas cadeias são revestidas por uma proteína hidrofílica chamada sericina que representa 25-30% do casulo total do bicho-da-seda<sup>11</sup>. A FS é purificada pelo aquecimento dos casulos em uma solução alcalina. A cadeia primária da fibroína consiste praticamente em glicina (43%), alanina (30%) e serina (12%)<sup>12</sup>. Esses aminoácidos mediam interações importantes entre células de mamíferos e a matriz extracelular, facilitando a adesão e o crescimento celular<sup>10</sup>.

A FS possui várias propriedades desejáveis, incluindo a sua biocompatibilidade, facilidade com que pode ser quimicamente modificada, lenta taxa de degradação in vivo e a

sua capacidade de ser processada em múltiplos formatos a partir de qualquer solução aquosa ou solvente orgânico<sup>11</sup> e apresenta atividade antimicrobiana<sup>10</sup>.

Devido ao cultivo em grande escala de bichos-da-seda para a indústria têxtil, existem fontes de custo abundantes e razoáveis para este polímero natural. Contudo, para aplicações médicas, é necessária uma extração e preparação adequadas. A partir dos casulos crus, a sericina deve ser removida das fibras de fibroína para assegurar a biocompatibilidade. A sericina é um grupo de glicoproteínas solúveis que cobre a superfície da fibroína. Uma vez que esta proteína adesiva é removida, as fibras de fibroína são dissolvidas numa solução aquosa que pode ser posteriormente processada em diferentes materiais<sup>11</sup>.

A celulose é o biopolímero mais abundante na Terra e está presente em uma ampla variedade de espécies vivas, sendo obtidas principalmente de árvores e algodão. Também pode ser obtida a partir da bactéria *Gluconacetobacter xylinus*, a qual produz celulose nanobacteriana isenta de lignina e hemicelulose em uma rede hierárquica tridimensional composta por feixes de microfibrilas muito mais finas de tamanho nanométrico de 3,0 a 3,5  $\mu\text{m}$ <sup>10</sup>.

A celulose sintetizada pelas bactérias é microcristalina, apresenta capacidade de absorção de água superior à celulose vegetal e apresenta maior resistência mecânica quando hidratada<sup>13</sup>. Ao contrário de outros tipos de membranas sintéticas, a membrana de celulose bacteriana (CB) exibe uma alta resistência à corrosão química, é biocompatível, porosa e ainda possui boa resistência mecânica<sup>14</sup>. A CB pode ser produzida em quase qualquer forma devido à sua elevada moldabilidade durante a formação<sup>10</sup>. Propriedades únicas que a fazem ser um biopolímero com grande potencial a ser explorado pela biotecnologia, e outras áreas da ciência biomédica<sup>15</sup>.

Membranas de CB não foram citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas em células CHO-K1<sup>16</sup>, assim como membranas de FS não apresentaram citotoxicidade e proporcionaram o crescimento de células fibroblásticas, bem como mantiveram as funções celulares<sup>17</sup>.

## 1.2 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é um sal de fosfato de cálcio hidroxilado com um elevado grau de dureza, que constitui o componente principal de substância inorgânica dos ossos e dentes, onde é parcialmente substituído por fluorapatita. É solúvel somente em um ambiente fortemente ácido. Os osteoblastos formam HA a partir de íons fosfato e cálcio, incorporados nos ossos humanos, os quais são compostos por aproximadamente 70% de matrizes minerais. A cerâmica HA é quimicamente quase idêntica à HA natural<sup>8</sup>.

A HA apresenta propriedades biológicas como biocompatibilidade e osteocondução<sup>18</sup>. Devido às suas características de bioatividade e reabsorção, promove ligação direta com os tecidos vivos e promove degradação lenta e gradual do material com a finalidade de substituição dos tecidos em que são implantados<sup>19</sup>.

As biocerâmicas à base de fosfato de cálcio (hidroxiapatita sintética e fosfato tricálcico) se assemelham aos componentes inorgânicos do tecido ósseo. Estas similaridades as tornam propícias à adesão celular e à neoformação do tecido ósseo<sup>20</sup>, o que as tornam excelentes materiais para proporcionar uma melhor bioatividade aos materiais para reparação/regeneração óssea. Entretanto, as biocerâmicas possuem baixa resistência mecânica quando comparado a materiais poliméricos e metálicos<sup>21</sup>, exemplificado pela HA que tem boa bioatividade e osteocondutividade, porém é muito frágil e apresenta baixa resistência à tração<sup>22</sup>.

Apesar disto, a associação destas cerâmicas com materiais polímeros tem se tornado uma opção atrativa para o desenvolvimento de compósitos para reconstrução óssea, pois desta forma, obtêm-se materiais com resistência mecânica adequada e ainda com bioatividade favorecida pela cerâmica<sup>23, 24</sup>.

Partículas de HA nanométricas estão associadas a um nível menor de citotoxicidade in vitro com boas ligações celulares e crescimento de osteoblastos humanos<sup>25,8</sup>.

Biomateriais estão sendo desenvolvidos utilizando a FS como a parte orgânica de compósitos, com adição de compostos inorgânicos como a HA, a fim de melhorar as propriedades dos materiais, tornando-os mais similares ao tecido ósseo<sup>26</sup> mostrando resultados promissores para a regeneração óssea<sup>27, 26, 28</sup>.

Os compósitos HA/BC apresentam aplicações potenciais na engenharia de tecidos ósseos com características marcantes como propriedades mecânicas elevadas, porosidade suficiente, moldabilidade, excelente biocompatibilidade e boa capacidade de ligação óssea<sup>29</sup>.

### 1.3 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs do termo em inglês – *bone morphogenetic proteins*) pertencem à família TGF- $\beta$  (*transformation growth factor –  $\beta$* )<sup>3</sup> identificadas como o fator osteoindutivo mais relevante na matriz óssea desmineralizada. Embora exista uma vasta gama de BMPs descritas na literatura, as BMPs 2, 4, 6 e 7 (também chamadas OP-1) são geralmente consideradas as mais osteoindutoras<sup>2</sup>.

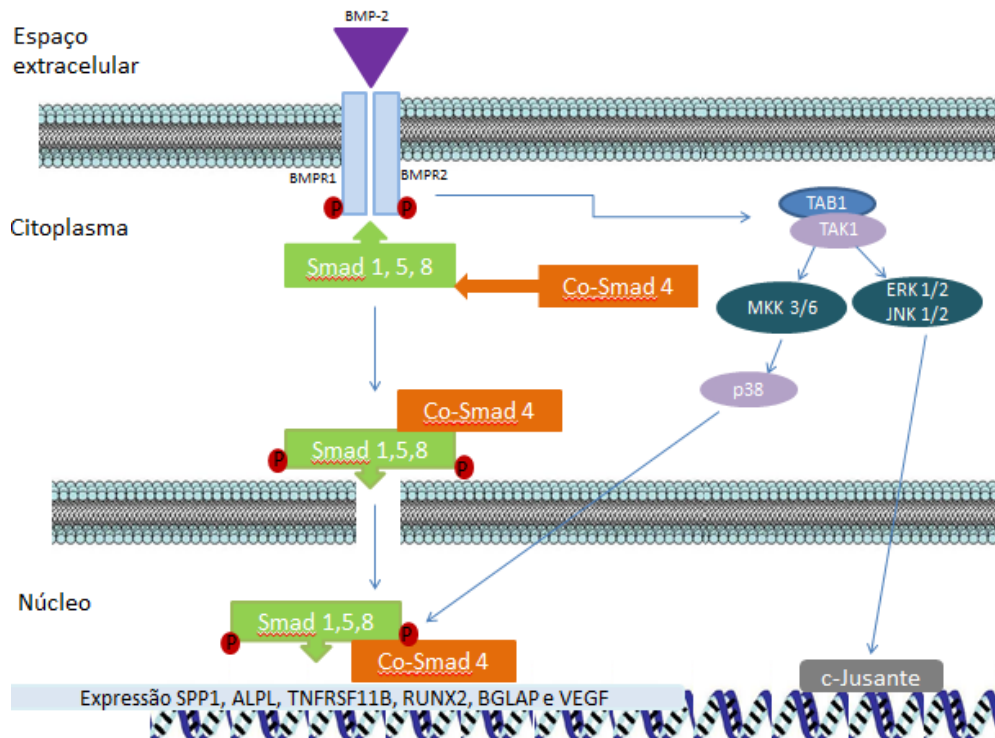
O principal papel das BMPs é o recrutamento de células mesenquimais para o local de cicatrização e, em seguida, diferenciá-las em linhagem osteogênica, resultando em nova

formação óssea<sup>2,8</sup>. A BMP-2 desempenha um papel importante na expressão de marcadores osteogênicos como *Fosfatase Alcalina*, do inglês- *alkaline phosphatase (ALPL)*, a *osteocalcina* e a proteína quinase *Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)*. Ao mesmo tempo, provavelmente está também envolvida na expressão dos fatores de transcrição nuclear *RUNX2*. As BMPs já foram utilizadas em estudos pré-clínicos e clínicos. Apesar de bons resultados terem sido obtidos, houve um problema com relação à definição da dose terapêutica, a qual variou bastante, dificultando a definição de uma concentração ideal para aplicações em humanos<sup>2</sup>.

BMPs desempenham um papel essencial na regulação da osteogênese, bem como na remodelação óssea pela proliferação e diferenciação de osteoblastos. Tradicionalmente, acredita-se que estes caminhos sejam ativados pela ligação de BMPs em um receptor ligante-específico de membrana, receptores BMP tipo 1 (BMPRI) e receptores BMP tipo 2 (BMPRII). A ligação do receptor inicia a transdução de sinal através da fosforilação de várias proteínas SMAD e sua translocação nuclear. Os SMADs também funcionam como fatores de transcrição, controlando a expressão de genes osteogênicos essenciais envolvidos na proliferação de osteoblastos (*Msx2*), síntese da matriz (*RUNX2*, *osteopontina-SPP1*, *fosfatase alcalina-ALPL*) e inibição de diferenciação dos osteoclastos (*TNFRSF11B-osteoprotegerina*)<sup>30</sup>.

Além da sinalização BMP/SMAD, as cascatas MAPK representam uma via alternativa, não-canônica para a transdução de sinal de BMP-2. BMP-2 ativa as vias de sinalização p38, ERK1/2 e JNK1/2 para promover a expressão e ativação de um fator de transcrição específico relacionado ao *RUNX2*. *RUNX2* tem um papel essencial na diferenciação osteoblástica de células-tronco e diretamente estimula a transcrição de importantes genes alvo à jusante, incluindo aqueles que codificam *osteocalcina (BGLAP)*, colágeno tipo 1 (*COL1A1*) e *osteopontina (SPP1)*<sup>25</sup>. O mecanismo de ação do BMP-2 na expressão de marcadores osteogênicos pode ser verificada através da cascata de sinalização na Figura 1.

Figura 1 - Cascata de sinalização de BMP-2 na expressão de marcadores osteogênicos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Kneser et al.<sup>3</sup> foi provado que sistemas de liberação inteligente apresentam importância crucial para a formação óssea confiável e aplicação econômica de BMPs. Com a ausência dos sistemas de liberação controlada, os fatores de crescimento rapidamente se difundem para longe dos dispositivos<sup>3</sup>.

A ossificação heterotópica, a cinética de liberação não ideal e, por último, mas não menos importante, o preço elevado representam um desafio para aplicação mais ampla destas substâncias<sup>3</sup>.

Proteínas recombinantes produzidas a partir da clonagem de BMPs humanas (rhBMPs - proteínas morfogenéticas recombinantes humanas) demonstraram capacidade para induzir a formação óssea<sup>31</sup>. Estas foram aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration), resultando em uma rápida aceitação para reparação de fraturas ósseas<sup>32</sup>.

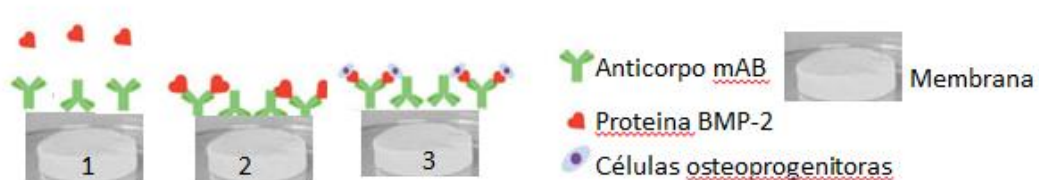
BMP/INFUSE (rhBMP-2) (Medtronic, Memphis, TN e EUA) foi aprovado pela FDA em 2002 como uma alternativa ao enxerto ósseo autólogo para fusões de vértebras lombares. Foi observado que efeitos adversos graves podem ocorrer após o uso de rhBMP-2 nas cirurgias de coluna vertebral. Complicações in vivo e in vitro em modelos animais atribuídas às BMPs (BMP-2, BMP-7) datam de meados de 2000. Essas complicações, particularmente

devido ao uso de doses mais altas, incluem processos inflamatórios, vascularização aumentada, proliferação fibroblástica e catabolismo<sup>33</sup>. De acordo com Epstien<sup>33</sup>, a literatura especializada recente reconhece que a utilização de BMP/INFUSE para realizar fusões espinhais contribui para a maior morbidade perioperatória e pós-operatória. Além disso, a produção de rhBMPs tem alto custo para o uso clínico, o que gera preocupação em relação ao custo-benefício<sup>34</sup>. Uma parte do elevado custo de rhBMPs está relacionada ao fato de doses supra-fisiológicas (1,5 mg/ml) das proteínas serem necessárias para se obter o resultado esperado, além da incapacidade de manter a concentração do fator de crescimento por longos períodos de tempo e a menor atividade biológica de rhBMPs em relação ao BMP endógeno<sup>35</sup>.

#### 1.4 Antibody Mediated Osseous Regeneration (AMOR)

A maioria dos processos biológicos é guiada por mediadores celulares específicos. A administração de apenas um fator de crescimento exógeno não apresentaria uma condição ideal para a cicatrização de feridas<sup>35</sup>. Como uma alternativa para a administração exógena de rhBMP-2, foi estudado o uso de anticorpos anti-BMP-2 imobilizados em scaffolds para a captura de BMP-2 endógena. O BMP-2 endógeno capturado seria capaz de induzir a diferenciação osteogênica de células-tronco osteoprogenitoras. Esta abordagem ficou denominada como (*Antibody Mediated Osseous Regeneration - AMOR*)<sup>35</sup>. O esquema de ligação dos anticorpos anti-BMP-2 em membranas para a captura de BMP-2 endógeno pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 -Esquema de imobilização de anti- BMP-2 em membranas. Demonstração da captura de BMP-2 endógeno e de células células-tronco osteoprogenitoras. 1) O mAb anti-BMP-2 é imobilizado em uma membrana de CB. (2) O mAb captura BMP-2 endógeno do microambiente. (3) O BMP-2 capturado por mAb atrai e liga em seu receptor celular específico células osteoprogenitoras, promovendo sua diferenciação osteogênica.



Fonte: Elaborado pela autora

Freire et al.<sup>35</sup> investigaram o potencial regenerativo de BMP-2, visando a captura de BMP-2 endógena com a utilização de clones de anticorpos imobilizados em scaffolds de esponja de colágeno absorvível em defeito de calvária de ratos. Análises de micro-CTs (microtomografias computadorizadas) demonstraram que logo após duas semanas pós-cirúrgicas ocorreu um preenchimento ósseo estatisticamente significativo com o tratamento dos clones de anticorpos anti-BMP-2: 4B12 e 3G7. A presença da molécula de anticorpo nos estágios iniciais da cicatrização alterou o comportamento celular pelo aumento da infiltração celular, bem como, pela ativação da expressão gênica de BMP-2, BMP-4 e BMP-7. O anticorpo monoclonal reagiu com BMP-2, BMP-4 e BMP-7 *in vitro* e *in vivo*, levando a concentrações significativamente maiores dessas moléculas no local durante a cicatrização precoce. A eficácia de anti-BMP-2 3G7 na regeneração de osso novo foi quantitativamente comparável ao de rhBMP-2 e qualitativamente equivalente ao osso endógeno.

Ansari et al.<sup>36</sup> utilizando do conhecimento osteogênico *in vivo* da abordagem AMOR, investigaram a ação deste em diferentes matrizes: micro-esferas de titânio, hidrogel de alginato e esponja de colágeno absorvível. Os estudos *in vivo* utilizaram a análise de micro-CTs em defeitos em calvária de ratos. Foi observada e quantificada a formação óssea nos 3 tipos de scaffolds após 8 semanas de implantação, tendo sido diferente do controle negativo. O scaffold de titânio apresentou maior formação óssea devido às microesferas contribuírem para um maior volume de material nas calvárias de ratos, possuírem radiopacidade e não serem biodegradáveis.

Em ambos os estudos, a utilização de anticorpos anti-BMP-2 foi capaz de capturar múltiplos mediadores osteogênicos devido ao alto grau de homologia entre o gene humano BMP-2 em relação a outras espécies, incluindo chimpanzé (99,3%), vaca (94,3%), camundongo (92,5%) e rato (92,2%). Esta pode ser a razão que os anticorpos gerados contra o antígeno humano BMP-2 possam mediar a regeneração óssea em calvária de ratos.

### **1.5 Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade**

Para um composto ser classificado como biomaterial este deve ser biocompatível e quimicamente inerte ou estável<sup>37</sup>. Logo, a utilização de um biomaterial compatível não deve desenvolver reações tóxicas, alérgicas ou carcinogênicas. No intuito de verificar se os materiais propostos neste projeto apresentam essas propriedades, foram realizados ensaios *in vitro* para investigação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Citotoxicidade é estabelecida como o potencial de um material em produzir efeitos letais ou sub-letais<sup>38</sup>. Um dos mais utilizados e eficientes métodos de avaliar a citotoxicidade

é por meio do kit XTT, que quantifica a capacidade da enzima desidrogenase presente nas mitocôndrias viáveis de converter o sal tetrazólio hidrossolúvel XTT (cor amarela) em compostos de formazana por meio de espectrofotômetro<sup>39</sup>. O ensaio de Sobrevivência Clonogênica é capaz de avaliar quantitativamente o efeito sub-letal da citotoxicidade. O método consiste em avaliar se um determinado tratamento pode ou não prejudicar a capacidade proliferativa das células; ou seja, se as células mantêm sua capacidade de formarem colônias após tratamento com determinada substância<sup>38</sup>.

A genotoxicidade é definida como o potencial que uma substância tem de reagir com o DNA da célula. Esse contato pode resultar tanto em um efeito genotóxico, caso as enzimas endógenas de reparo do DNA possam reparar as quebras de fita simples e/ou dupla do DNA; como em um efeito mutagênico, caso tais alterações no DNA de uma célula não sejam passíveis de reparação, sendo transmitidas de modo estável às células filhas no processo de divisão celular<sup>40</sup>.

Descrito por Singh et al.<sup>41</sup> o Ensaio Cometa ou *single cell gel assay* é um excelente método para investigar se um material pode apresentar atividade genotóxica em um tecido. Os fragmentos decorrentes da quebra de fitas simples e duplas de DNA migram do núcleo, de acordo com o dano ocorrido na molécula<sup>41</sup>.

Segundo Darroudi e Natarajan<sup>42</sup>, os danos causados ao DNA e que podem ser detectados por meio do ensaio Cometa, podem estar sujeitos aos processos de reparo celular. Somente uma pequena parcela dos danos provocados no DNA é que serão fixados gerando as mutações, isso ocorre por causa da capacidade de reparo das células, devido ao estágio do ciclo celular que a célula se encontra e ao tipo de agente mutagênico<sup>43</sup>.

De acordo com Poersch et al.<sup>44</sup> o estudo do dano genético ao nível cromossômico é essencial para a genética toxicológica, pois as mutações cromossômicas são um importante evento da carcinogênese. Entre os métodos mais utilizados para avaliar danos cromossômicos, destaca-se o teste do micronúcleo, que é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal que se forma durante a telófase da mitose ou meiose, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. Desse modo, são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal, representando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou distúrbio no aparato mitótico<sup>45</sup>.

## 1.6 Investigação da Expressão Gênica

Uma importante estratégia para verificar *in vitro* e/ou *in vivo* se um determinado material ou substância tem papel na modulação da expressão de genes e proteínas importantes para reparação/regeneração óssea é por meio da investigação da expressão gênica e protéica. Foi verificada em uma linhagem mioblástica (C2C12) que a utilização da abordagem AMOR (utilizando anti-BMP-2) resultou em efetiva diferenciação óssea, inclusive promoveu o fechamento de um defeito ósseo crítico em calvária de ratos<sup>46</sup>. Geralmente, quando se deseja investigar a expressão de genes mediada pela presença de substâncias ou materiais, costuma-se cultivar células de uma linhagem relacionadas ao tecido que estará em contato com o material. No que se refere à reparação/regeneração óssea, costuma-se cultivar as células MC3T3-E1 (pré-osteoblastos de calvária de camundongo) sobre o material objeto de investigação<sup>47</sup>.

Como já descrito por Huang et al.<sup>25</sup> e por Rath et al.<sup>30</sup>, as proteínas BMPs possuem um papel especial na via de expressão de diversos genes osteogênicos envolvidos na proliferação de osteoblastos, síntese da matriz, inibição de diferenciação dos osteoclastos e também na transcrição de importantes genes alvo à jusante. Podem ser destacados alguns genes osteogênicos como os genes da *osteopontina (SPPI)*, *fosfatase alcalina (ALPL)*, *osteoprotegerina (TNFRS11B)*, *RUNX2*, *osteocalcina (BGLAP)* e do *fator de crescimento endotelial (VEGF)*.

O gene *SPPI*, localizado no cromossomo 5, é responsável por codificar a proteína envolvida na ligação de osteoclastos à matriz óssea mineralizada. A proteína codificada é secretada e se liga à hidroxiapatita com alta afinidade. O receptor de fibronectina de osteoclastos é encontrado na membrana celular e pode estar envolvido na ligação a esta proteína<sup>48</sup>. O produto do gene *ALPL*, localizado no cromossomo 4, é uma enzima glicosilada, a qual pode desempenhar um papel na mineralização óssea. As mutações neste gene têm sido associadas à hipofosfatase, uma desordem caracterizada por hipercalemia e defeitos esqueléticos<sup>49</sup>.

Também conhecido por *OGP*, o gene *TNFRS11B* está localizado no cromossomo 8 e codifica uma proteína a qual pertence a uma superfamília do receptor de TNF. Esta proteína é um receptor de osteoblastos que funciona como um regulador negativo da reabsorção óssea. Esta proteína se liga especificamente ao seu ligante de osteoprotegerina, os quais são reguladores extracelulares chave do desenvolvimento de osteoclastos<sup>50</sup>.

Membro da família *RUNX* de fatores de transcrição, o gene *RUNX2* localiza-se no cromossomo 17 e codifica uma proteína nuclear com um domínio Runt de ligação ao DNA.

Esta proteína é essencial para a diferenciação osteoblástica e morfogênese esquelética e atua como um arcabouço para ácidos nucleicos e fatores reguladores envolvidos na expressão do genes importantes para o desenvolvimento ósseo<sup>51</sup>.

O gene *BGLAP*, localizado no cromossomo 3, codifica uma proteína óssea altamente abundante segregada por osteoblastos que regula a remodelação óssea e o metabolismo energético. A proteína codificada contém um domínio Gla (carboxilglutamato gama), que funciona na ligação ao cálcio e à hidroxiapatita<sup>52</sup>. Membro da família de fatores de crescimento de *PDGF/VEGF*, o gene *VEGF* está localizado no cromossomo 17 e induz a proliferação e migração de células endoteliais vasculares e é essencial tanto para angiogênese fisiológica quanto patológica<sup>53</sup>.

Apesar do que já se conhece de biomaterias para a promoção do reparo ósseo, o presente estudo revela uma estratégia para buscar atender as necessidades da indústria quanto a confecção de um biomaterial com uma formação óssea confiável e aplicação econômica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

O objetivo deste estudo foi sintetizar e caracterizar dois tipos de compósitos manufaturados como membranas: um à base de FS e outro à base de CB (membranas), associados à HA e anticorpos anti-BMP-2, além de avaliar sua toxicidade e eficácia na modulação da expressão de genes importantes para reparação/regeneração óssea.

### **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1. Sintetizar dois tipos de compósitos: um à base de FS e outro à base de CB (membranas), associados à HA e anticorpos anti-BMP-2;

2.2.2. Caracterizar físico-quimicamente os compósitos por meio dos ensaios: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia por dispersão de energia e raio X (EDS), espectroscopia de infravermelho (Fourier-transform infrared spectroscopy - FTIR), análise das propriedades mecânicas e análise da hidrofiliabilidade pelo ensaio do ângulo de contato;

2.2.3. Avaliação da toxicidade in vitro nas linhagens CHO-K1 e MC3T3-E1 pelos ensaios de citotoxicidade (Ensaio do XTT e Sobrevivência Clonogênica), genotoxicidade (Ensaio Cometa) e mutagenicidade (Teste do Micronúcleo);

2.2.4. Estudos de cinética de adsorção de anticorpos in vitro detectados por anticorpos secundários anti-IgG conjugados com FITC por meio de microscopia de imunofluorescência;

2.2.5. Avaliação da expressão de genes importantes para reparação óssea através da realização de PCR em tempo real (RT-qPCR);

2.2.6. Avaliação da formação de nódulos minerais por vermelho de alizarina e da atividade de ALP.

2.2.7. Quantificação da Produção de IL-6 e TGF- $\beta$  por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram desenvolvidos dois tipos de compósitos, um à base de FS e HA e outro à base de CB e HA, ambos associados ao anticorpo anti-BMP-2 (Tabela 1).

Tabela 1 -Materiais desenvolvidos à base de FS ou CB, associados à HA e anticorpo anti-BMP-2.

<b>Materiais:</b>
<b>Celulose Bacteriana (CB)</b>
<b>Celulose Bacteriana+ anti-BMP-2 (CB- antiBMP-2)</b>
<b>Celulose Bacteriana + hidroxiapatita (CB-HA)</b>
<b>Celulose Bacteriana + hidroxiapatita + anti-BMP-2 (CB-HA-antiBMP-2)</b>
<b>Fibroína (FS)</b>
<b>Fibroína + anti-BMP-2 (FS-antiBMP-2)</b>
<b>Fibroína + hidroxiapatita (FS-HA-antiBMP-2)</b>
<b>Fibroína + hidroxiapatita + anti-BMP-2 (FS-HA-antiBMP-2)</b>

Fonte: Elaborada pela autora

#### 3.1 Preparação e Caracterização das Membranas de CB e de FS

##### Produção da celulose bacteriana

A produção de CB, sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, ocorreu em meio de cultura apresentando a seguinte composição básica: glicose 50 g/L (m/v), extrato de levedura 4 g/L, fosfato de potássio monobásico anidro (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 2 g/L, sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) 0,73 g/L e etanol 20 g/L a 30°C.

Preparo do meio: Foram pesados 4 g de extrato de levedura, 0,73 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em um erlenmeyer (1L) e adicionados 680 mL de água para que fossem dissolvidos. Em outro erlenmeyer (500 mL) foi adicionado 50 g de glicose e 300 mL de água para que também fosse dissolvida. Os conteúdos de ambos os erlenmeyers foram autoclavados separadamente, pois a glicose é muito reativa e pode reagir com os outros componentes.

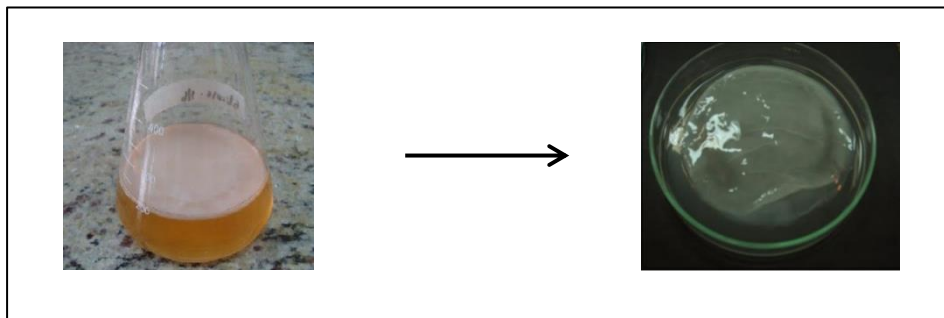
Após ser autoclavado, o etanol foi adicionado ao meio em fluxo laminar. O meio preparado foi então adicionado em erlenmeyer de 250 mL, respeitando a proporção de 5:1, adicionado 45 mL de meio.

Pré-inóculo: 10% de *Acetobacter xylinum* e 90% do meio (5 mL de pré-inóculo e 45 mL de meio) foram inoculados, sempre flambando os frascos e incubados a 30°C por 24 horas.

Inoculação: O pré-inóculo foi utilizado na inoculação dos meios (50 mL de inóculo e 450 mL de meio) e 100 mL foram adicionados em placas petri de 13 cm de diâmetro e incubados por 5 dias a 30°C para a produção da celulose.

Após esse período, as membranas de CB produzidas foram lavadas inicialmente com água corrente (3 dias), tratadas com 300 mL de NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup> a 80°C por 30 min. A solução de NaOH foi trocada e deixada por mais 30 minutos. Na sequência, as membranas foram lavadas com água destilada por 3 dias até verificação de pH neutro, como pode ser visualizada na Figura 3.

Figura 3 -Produção da membrana de celulose bacteriana. A- Inoculação do meio de cultura. B- Manta de CB produzida.



Fonte: Elaborado pela autora

### **Produção da fibroína**

Extração da fibroína: A produção da fibroína ocorre pela extração dos casulos de *Bombyx mori* de acordo com o protocolo de Rockwood et al.<sup>11</sup>.

Em um recipiente, foi adicionado 4 L de água deionizada para 5 g de casulos e 4,24 g de carbonato de cálcio, os quais foram mantidos em aquecimento por até 30 minutos após a fervura. Ocasionalmente, deve-se agitar com uma espátula para promover a boa dispersão de fibroína.

A fibroína extraída foi removida com a ajuda de uma espátula e lavada em água ultra pura. Em seguida, foi adicionado 2 L de água deionizada e lavada em água durante 20 min enquanto se agitava suavemente sobre uma placa de agitação. Esse procedimento foi repetido por duas vezes, obtendo um total de três lavagens.

Após a terceira lavagem, a fibroína foi espalhada sobre um papel de alumínio e deixada em estufa para secagem por 24 horas.

Para a dissolução da fibroína, foram testadas as soluções LiBr e  $\text{CaCl}_2$  quanto à viabilidade celular e pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Como não houve diferença entre elas, a dissolução da fibroína foi realizada em solução de  $\text{CaCl}_2$ .

Dissolução da fibroína em  $\text{CaCl}_2$ : A cada 10 gramas de fibroína foram adicionados 100 mL da solução de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{EtOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1:2:8 molar) e a suspensão mantida em  $85^\circ\text{C}$  em banho termostaticado até a dissolução completa.

Diálise da fibroína: Diálise contra 1 L de água ultrapura para 12 mL de solução de fibroína em uma fita de diálise. Para assegurar a mistura, uma grande barra de agitação foi usada e colocada uma barra magnética para agitar a placa. A água foi trocada após 1h, 4h, naquela noite, na manhã seguinte e na noite seguinte, bem como na parte da manhã do dia seguinte (ou seja, seis trocas dentro de 48 h).

Foi realizada uma centrifugação para remover impurezas a 20.000 rpm a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 min e a centrifugação foi repetida por mais uma vez. O esquema de produção pode ser verificado na Figura 4.

Figura 4 -Produção da FS de acordo com o protocolo de Rockwood et al. (2011)<sup>11</sup>



Fonte: Elaborado pela autora.

**Avaliação da toxicidade da fibroína: Ensaio de Citotoxicidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para confirmação da separação e eliminação da proteína Serecina**

As fibras de fibroína possuem aproximadamente 10-25  $\mu\text{m}$  e consistem em duas cadeias proteicas: uma cadeia leve (26KDa) e a pesada (390 kDa) ligadas por uma simples ligação de dissulfeto. As cadeias leve e pesada da fibroína são revestidas pela proteína sericina, a qual apresenta uma relativa toxicidade para a fibroína, caso não seja removida por completo. Para verificar a toxicidade da fibroína e a total remoção da sericina, foram realizados os ensaios *in vitro* de citotoxicidade (teste do XTT) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

***Eluato***

A avaliação do material foi feita recolhendo substâncias referentes a cada etapa do processo de extração da fibroína (Tabela 2). As soluções extraídas foram obtidas a partir do preparo de eluato, confeccionado de acordo com a ISO 10993-12<sup>54</sup>. O material foi imerso em meio de cultura HAMF10: D-MEN (1:1) com ausência de soro fetal bovino, a 37°C por 24 horas, sob agitação a 133 rpm em incubadora (New Brunswick Scientific – Excella E24 Incubator Shaker Series).

Tabela 2 -Materiais testados durante extração da fibroína.

---

**Materiais:**

---

**Casulo (A)**

**Algodão obtido após a extração da sericina com  $\text{NaCO}_3$  (B)**

**Solução restante da extração do casulo com  $\text{NaCO}_3$  (C)**

**Solução viscosa final obtida a partir da solução de  $\text{LiBr}$  (D)**

**Solução viscosa final obtida a partir da solução de  $\text{CaCl}_2$  (E)**

---

Fonte: Elaborado pela autora

***Cultura Celular e Tratamentos***

Para realização dos experimentos foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), com ciclo de divisão de aproximadamente 14 horas, crescidas em meio de cultura HAM-F10:D-MEM (1:1), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e kanamicina (1%) mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram cultivadas e repicadas até atingirem a terceira passagem.

### ***Teste de Citotoxicidade – Viabilidade celular (XTT)***

Foram semeadas  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços num volume de 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos colocando-se eluatos na concentração de 100% por 24 horas, além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFS e sem material). Para o CP, foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (3,0 µg/mL por 24 horas). Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata.

Após o tempo de tratamento, os eluatos foram removidos de cada poço, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e receberam 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e, com a câmara de fluxo com a luz apagada, foram inseridos em cada poço 500 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem fenol vermelho, seguido da adição de 60 µL da solução XTT/elétron (50:1) (Cell Proliferation Kit II – Roche Applied Science). Após 3 horas em estufa, 200 µL do meio de cada poço foi transferido para placa de 96 poços para leitura colorimétrica em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 492 nm normalizada a 690 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (células viáveis). Foram feitas três repetições independentes.

### ***Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)***

A cromatografia foi realizada para verificação dos picos presentes na solução restante da extração do casulo com NaCO<sub>3</sub>, ou seja, que deveria conter a proteína serecina e nas soluções viscosas finais obtidas a partir da solução de LiBr e a partir da solução de CaCl<sub>2</sub>, as quais deveriam conter apenas a proteína fibroína.

A análise foi realizada com a colaboração de pesquisadores do Instituto de Química de Araraquara – UNESP e, assim, foi possível verificar se a extração foi efetiva.

### **Preparação da solução de hidroxiapatita**

A hidroxiapatita foi incorporada à CB e à FS segundo a metodologia de Hutchens<sup>55</sup> e Saska<sup>56</sup>. As membranas de CB ou de fibroína foram imersas em solução de etanol 20%, a temperatura ambiente (TA) por 24 h. Para precipitação da HA, cada uma das amostras previamente desidratadas foram imersas primeiramente em 20 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 0,05

mol.L<sup>-1</sup> por 24 h a temperatura ambiente e, posteriormente, cada amostra foi imersa em 20 mL de solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> por 24 h a TA.

Para obtenção das membranas CB-HA ou FS-HA, as amostras foram secas em molde prensado. Após a secagem, as membranas foram acondicionadas em envelopes apropriados e foram esterilizadas com radiação gama a 20 kGy.

### **Caracterização das membranas**

Os compósitos CB-HA e FS-HA foram caracterizados para elucidar a síntese dos respectivos compósitos e a interação dos anticorpos aos materiais. Desta forma, foram analisados:

#### **3.1.1 Morfologia e estrutura dos compósitos bem como a análise dos cristais de apatita incorporados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por dispersão de energia e raio X (EDS)**

As micrografias foram realizadas para verificar a estrutura fina da morfologia da superfície das amostras e a microanálise semi-quantitativa por EDS para verificar a razão molar Ca/P dos compósitos CB-HA, FS-HA. Cada amostra foi colocada em suporte de cobre para a realização das microanálises semi-quantitativas com tensão de 5 Kv. Posteriormente, as amostras foram recobertas com uma camada de carbono com espessura de 10 nm durante 80 segundos, tensão de 3 Kv e corrente de 15 µA. As micrografias foram realizadas sob tensão de 10-25 Kv. As micrografias e o EDS foram obtidos em microscópio eletrônico modelo FEG-MEV; JEOL modelo 7500F realizadas no Laboratório de Caracterização (Instituto de Química- Universidade Estadual Paulista – UNESP). O software ImageJ foi utilizado para analisar o tamanho das fibras da membrana de CB e a calibração foi feita utilizando a escala em barras da respectiva micrografia.

#### **3.1.2 Análise dos grupos funcionais relacionados às fases de apatita nas membranas por FTIR**

Os espectros de FTIR foram obtidos usando um espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier – (Vertex 70, Bruker). Os espectros foram realizados sob as seguintes condições: porcentagem de absorbância (%A) com acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm<sup>-1</sup>, na faixa de absorção de 400-4000 cm<sup>-1</sup>.

### 3.1.3 Análise das propriedades mecânicas

A espessura das membranas foi determinada utilizando um micrômetro Digital MDC-Lite (Mitutoyo®), sendo as medidas obtidas em 5 pontos aleatórios de cada filme ( $n = 5$ ). Os parâmetros de resistência à perfuração ( $R_p$ ), alongamento durante a perfuração ( $A_p$ ) e energia na perfuração por unidade de volume ( $E_p$ ) foram determinadas em analisador universal de textura TA-XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems) equipado com sonda em aço inoxidável com ponteira esférica ( $D = 2,5\text{cm}$ ). Secções das membranas ( $n=8$ ) foram fixadas sobre um suporte metálico com um orifício circular ( $D = 5\text{cm}$ ) a uma distância de 25 mm da sonda. A sonda metálica desceu perpendicularmente à superfície da membrana com velocidade constante de  $1\text{mm s}^{-1}$ , em direção ao centro do orifício circular, sendo que durante a perfuração da membrana a velocidade foi de  $0,10\text{mm s}^{-1}$ . A força de gatilho foi de 0,005 kg. Curvas de força versus deslocamento foram registradas até o momento da ruptura da membrana e utilizadas para determinar suas propriedades mecânicas, como resistência à perfuração ( $R_p$ ), alongamento durante a perfuração ( $A_p$ ) e energia na perfuração por unidade de volume ( $E_p$ ), de acordo com as equações 1, 2 e 3, respectivamente<sup>57</sup>. Foram verificadas essas propriedades em amostras secas e úmidas, as quais foram imersas em solução de fluido corporal simulado (Simulated body fluid - SBF), pH 7,4, que possui concentração iônica semelhante ao do plasma sanguíneo, preparado de acordo com Kokubo et al.<sup>59</sup> por 24h.

$$R_p = \frac{F}{A} \quad \text{Equação 1}$$

em que  $F$  é a força requerida para a ruptura do membrana e  $A$  é a área da seção transversal da membrana ( $A = 2rd$ , onde  $r$  é o raio do orifício e  $d$  a espessura da membrana).

$$A_p\% = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} \cdot 100\% \quad \text{Equação 2}$$

em que  $r$  é o raio da membrana exposto no orifício da placa e  $d$  o deslocamento do dispositivo do ponto de contato até a ruptura da membrana.

$$E_p = \frac{AUC}{V} \quad \text{Equação 3}$$

em que  $AUC$  é a área sob a curva força versus deslocamento e  $V$  o volume da membrana ( $V = \pi r^2 h$ ) localizado no orifício da placa.

### 3.1.4 Análise de ângulo de contato para determinar as propriedades hidrofílicas dos compósitos antes e após a imobilização dos anti-BMP-2

O ângulo de contato foi medido pelo equipamento Dataphysics modelo OCA-15 equipado com uma câmera CCD. O método utilizado para realizar as medidas foi o de gotejamento utilizando água deionizada (tensão superficial: 72.30 mN/m); a gota foi dispensada por uma seringa com uma agulha de 0,5 mm de diâmetro, com um volume de 10  $\mu\text{L}$ , numa velocidade de gotejamento de 1  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$  sobre as superfícies das membranas. As imagens das gotas capturadas foram analisadas empregando o software SCA20. Desta forma, o ângulo de contato formado pela gota na superfície da amostra foi mensurado. As medidas para ângulo de contato foram realizadas para todas as amostras em triplicata ( $n=3$ ), a temperatura ambiente. As medidas foram realizadas após 10 s ( $T = 10\text{s}$ ) e a média  $\pm$  desvio padrão destes valores foram calculados. A medida do ângulo de contato entre a gota a superfície do material caracteriza a hidrofiliicidade desta superfície conforme apresentado na Tabela 3. Esta propriedade influencia diretamente na resposta biológica de um material implantado podendo alterar adsorção de proteínas, coagulação sanguínea e, principalmente, afetar a adesão celular.

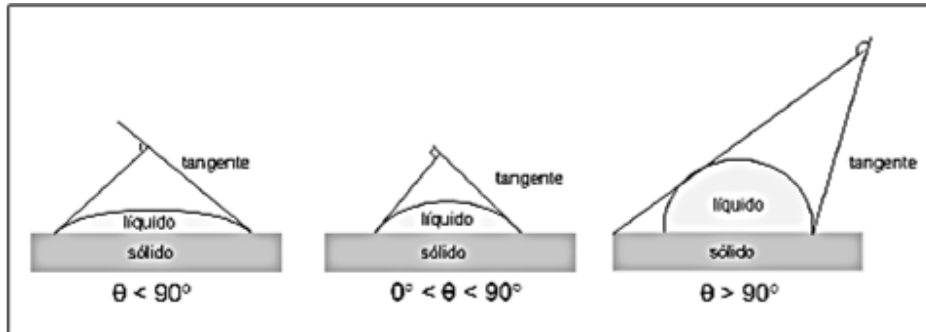
Tabela 3 - Ângulos de contato e condições de hidrofiliicidade.

$\theta = 0$	Hidrofiliicidade
$0 < \theta < 90^\circ$	Hidrofiliicidade parcial
$\theta > 90^\circ$	Hidrofobicidade

Fonte: Elaborado pela autora

Os diferentes ângulos de contatos formados no limite da interceptação do líquido com o sólido estão apresentados na Figura 5. Quando ocorre o espalhamento da gota do líquido, a força de adesão entre as moléculas das duas fases supera a força de coesão; por outro lado, quando a força de atração entre as moléculas é superior a força de coesão entre as fases, não há molhabilidade ou espalhamento da gota.

Figura 5 -Representação dos níveis de interação gota-superfície de acordo com o ângulo de contato.



Fonte: Thomazini et al.<sup>58</sup>. Figura adaptada.

### 3.2 Ensaios in Vitro para Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade das Membranas

Para realização dos experimentos foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) e células de calvária (pré-osteoblastos) de camundongos (MC3T3-E1), crescidas em meio de cultura DEMEM e  $\alpha$ -MEM, respectivamente, suplementados com 10% de SFB e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas e repicadas até atingirem a 3ª passagem. Como referência, cada ensaio contou com duplicatas de cada tratamento. Para cada ensaio foram feitas três repetições independentes. Para esses ensaios não foram utilizados os materiais contendo anticorpos, uma vez que é sabido da não toxicidade desses anticorpos, e devido ao alto custo desses componentes, sendo avaliados somente nos ensaios em que demonstrariam seu potencial de atividade.

#### 3.2.1 Ensaios de citotoxicidade

##### Ensaio XTT

##### **Linhagem CHO-K1**

Foram semeadas  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços num volume de 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB, e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB, CB+HA, FS, FS+HA por 24 horas, além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem material). Cada poço recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFB com exceção do Controle Positivo (CP).

Para o CP, foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (3,0 µg/mL por 24 horas). Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata.

Após o tempo de incubação, as membranas foram removidos de cada poço, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e receberam 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, as culturas foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e, com a câmara de fluxo com a luz apagada foi colocado em cada poço 500 µL de meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sem fenol vermelho (Cultlab) com 60 µl da solução (Cell Proliferation Kit II – Roche Applied Science). Após 3 horas em estufa, 200 µL do meio de cada poço foi transferido para placa de 96 poços para leitura colorimétrica em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 492 nm normalizada a 690 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (células viáveis).

### **Linhagem MC3T3-E1**

Foram semeadas  $5 \times 10^3$  células em placas de 48 poços num volume de 1 mL de meio  $\alpha$ -MEM (1:1) suplementado com 10% de SFS e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB+HA por 7,14 e 21 dias, além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem material). Cada poço recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFB com exceção do CP. Para o CP, foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (3,0 µg/mL por 24 horas). Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata. Após o tempo de incubação, seguiu-se o mesmo protocolo da linhagem CHO-K1.

### **Ensaio de Sobrevivência Clonogênica (ou Eficiência de Clonagem)**

#### **Linhagem CHO-K1**

Para o ensaio de sobrevivência clonogênica, foram semeadas  $4 \times 10^4$  células em 1 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB, incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB, CB+HA, FS, FS+HA por 24 horas, além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem material). Cada poço recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFB, com exceção do CP. O cloridrato de doxorrubicina (0,3 µg/mL por 4 horas) foi utilizado como CP.

Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata. Ao final do tratamento, as membranas e o meio de cultura foram removidos de cada poço e foram lavados com 250  $\mu$ L de PBS 1x e receberam 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após 24 h, os poços foram lavados com 250  $\mu$ L de PBS 1x, as células foram desprendidas por tripsinização e transferidas para um microtubo, num volume de 1 mL de meio de cultura para contagem em Câmara de Neubauer. Assim, para o ensaio de sobrevivência clonogênica, 150 células foram semeadas em cada frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>) com 5 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFS, em duplicada, além dos CN e CP. Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1x a 37°C. Foi descartado o PBS e as células foram fixadas com metanol:ácido acético:água destilada (1:1:8) a 37°C, por 30 minutos. As colônias foram coradas com 5 mL do corante Giemsa diluído em tampão fosfato a 37°C, na proporção de 1:20, por 20 minutos. Depois de coradas, as células foram lavadas com água destilada, para remover o excesso de corante.

O número de colônias contadas no CN foi considerado como 100%. A partir disso, foram realizados os cálculos das frações de sobrevivência (FS):

$$FS = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cada tratamento}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias observadas no CN}} \times 100$$

### **Linhagem MC3T3-E1**

Foram semeadas  $6 \times 10^4$  células em placas de 24 poços num volume de 1 mL de meio  $\alpha$ -MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB+HA por 24 horas, além do controle negativo (CN = poços contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem material). Cada poço recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFB com exceção do CP. Para o CP, foi utilizado cloridrato de doxorrubicina (0,3  $\mu$ g/mL por 4 horas). Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata. Após o tempo de incubação, seguiu-se o mesmo protocolo da linhagem CHO-K1, alterando-se apenas a quantidade de células semeadas de 150 para 300 células em frasco de cultivo (25 cm<sup>2</sup>) com 5 mL de meio  $\alpha$ -MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB.

### 3.2.2 Teste de genotoxicidade

#### Linhagem CHO-K1

Para o teste de genotoxicidade foi utilizada a metodologia descrita por Singh<sup>41</sup> para a versão alcalina do Ensaio Cometa.

Foram semeadas  $40 \times 10^3$  células em 1mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços, que foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. No segundo dia, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB, CB+HA, FS, FS+HA por 24 horas em cada poço em duplicata, além do CN (sem membrana). Para o Controle Positivo foi utilizada a solução de Peróxido de Hidrogênio (80 µM por 5 minutos).

Ao final do tratamento, as membranas foram removidas com uma pinça. As células foram lavadas com 250 µL de PBS 1x e receberam 1,0 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após 24 h, os poços foram lavados com 250 µL de PBS 1x, as células foram desprendidas por tripsinização e transferidas para microtubos, os quais foram centrifugados por 3 minutos a 2000 rpm. O pellet de células foi homogeneizado com 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão em volume suficiente para 200 µL. Esta solução de agarose com as células foi igualmente dividida e aplicada em 2 lâminas histológicas pré-gelificadas com 1,5% de agarose com ponto de fusão normal. Em seguida, foram cobertas com lamínulas e deixadas em geladeira por 10 minutos, quando após cuidadosa retirada da lamínula, as lâminas foram imersas em uma solução de lise (1% Triton X-100, 10% DMSO, 2,5 mmol.L-1 NaCl, 100 mmol.L-1 Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mmol.L-1 Tris, pH 10) por 12 horas protegidas da luz em geladeira. Posteriormente, as lâminas ficaram imersas em tampão de eletroforese alcalino (1 mmol.L-1 Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mmol.L-1 NaOH, pH 13) por 20 min para desnaturação do DNA. Em seguida, foi realizada corrida em eletroforese a 43 V e 308 mA por 25 min. Ao final, as lâminas foram transferidas para um recipiente contendo tampão de neutralização (Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, protegidas da luz em geladeira. Após secagem das lâminas a temperatura ambiente, as mesmas foram fixadas em etanol absoluto por 3 min. A análise foi feita em microscópio de fluorescência após coloração da lâmina com de 80 µL de solução de brometo de etídeo (0,2 M).

O dano ao DNA foi avaliado por um sistema de análise de imagem (TriTek CometScore®1.5, 2006, Sumerduck, VA, EUA). A porcentagem de DNA na cauda e Tail Moment foram obtidos para cada tratamento, sendo analisados 100 nucleóides para cada repetição. A análise do Tail Moment permite relacionar a quantidade de DNA fragmentado com a distância que os fragmentos migraram durante a eletroforese<sup>60</sup>.

### **Linhagem MC3T3-E1**

Foram semeadas  $50 \times 10^3$  células em 1mL de meio  $\alpha$ -MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços, que foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. No segundo dia, foram realizados os tratamentos colocando-se as membranas CB+HA em cada poço em duplicata por 24 horas, além do CN (sem membrana). Para o Controle Positivo foi utilizada a solução de Peróxido de Hidrogênio (80  $\mu$ M por 5 minutos). Após o tratamento, seguiu-se o mesmo protocolo da CHO-K1, alterando-se novamente apenas no período de contato da solução de lise (1% Triton X-100, 10% DMSO, 2,5 mmol.L-1 NaCl, 100 mmol.L-1 Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mmol.L-1 Tris, pH 10) por apenas 2 horas protegidas da luz em geladeira.

### **3.2.3 Teste de mutagenicidade**

#### **Linhagem CHO-K1**

O protocolo adotado para o teste de mutagenicidade foi o descrito por Fenech et al.<sup>45</sup> com algumas adaptações. Foram semeados  $37 \times 10^4$  células em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 5 mL de meio HAM-F10:D-MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos por 24 horas, colocando-se as membranas CB, CB+HA, FS, FS+HA em cada garrafa, além do controle negativo (CN = garrafas contendo apenas células sem meio de cultura com SFB e sem material). Cada garrafa recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFB com exceção do CP. O CP constou de cloridrato de doxorrubicina (0,15  $\mu$ g/mL) por 4 horas. Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata. Foram adicionados 25 $\mu$ l de citocalasina B (1mg/ml) em cada garrafa de 25 cm<sup>2</sup> por 24 h para interromper a citocinese.

Após o término dos tratamentos, as células foram lavadas, tripsinizadas, o conteúdo das garrafas foi transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL e centrifugados por 7 minutos a 1000 rpm. O pellet de células foi ressuspensionado em solução hipotônica gelada (KCl 0,3%) por 5 min. Essa suspensão celular foi centrifugada novamente e ressuspensa em 3 mL de fixador metanol:ácido acético (3:1) juntamente com quatro gotas de formol 1% e cuidadosamente homogeneizado com pipeta Pasteur. Após nova centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e a suspensão gotejada em 2 lâminas previamente limpas em metanol e mantidas em água destilada gelada.

As lâminas foram coradas com solução de Giemsa 3% diluído em tampão fosfato (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,06 M e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,06 M – pH 6,8) por 7 minutos, lavadas com água destilada e seca a temperatura ambiente.

Para a determinação do Índice de Divisão Nuclear (IDN), 500 células viáveis com citoplasma bem preservado foram contadas por lâmina codificada, usando um microscópio Leica DM500 e anotando-se as células que contiverem de 1 a 4 núcleos. O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker<sup>61</sup> utilizando a fórmula:  $IDN = [ M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4) ]/N$ , onde M1 a M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; e N é o número total de células viáveis.

Além disso, pela contagem de 1000 células binucleadas, foram analisadas a frequência de células binucleadas com micronúcleos (FBMN) e a frequência total de micronúcleos (FMN). Os critérios utilizados para identificação de micronúcleos foram baseados em Fenech et al<sup>45</sup>.

### **Linhagem MC3T3-E1**

Foram semeados  $40 \times 10^4$  células em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, contendo 5 mL de meio  $\alpha$ -MEM (1:1) suplementado com 10% de SFB. No dia seguinte, foram realizados os tratamentos por 24 horas, colocando-se as membranas CB+HA em cada garrafa, além do controle negativo (CN = garrafas contendo apenas células com meio de cultura sem SFB e sem eluato). Cada garrafa recebeu posteriormente uma suplementação de 10% de SFS com exceção do CP. O CP constou de cloridrato de doxorrubicina (0,15  $\mu$ g/mL) por 4 horas. Todos os tratamentos e os CN e CP foram realizados em duplicata. Foram adicionados 25  $\mu$ l de citocalasina B (1 mg/ml) em cada garrafa de 25 cm<sup>2</sup> por 48 h, para interromper a citocinese. Após o tratamento, seguiu-se o mesmo protocolo da CHO-K1.

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o Programa GraphPad Prism 5.01 e todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%. Os dados variaram entre paramétricos (apresentando aderência à curva normal) e não-paramétricos. Assim, para os paramétricos foram aplicadas a análise de variância (ANOVA) one-way, seguido do teste de Tukey. Também foi aplicado o teste de Dunnett, que compara os valores obtidos de cada um dos tratamentos com o de uma referência (no caso, o Controle Negativo). Para dados não-paramétricos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

### **3.3 Imobilização do Anticorpo Monoclonal Anti-BMP-2 nas Membranas de Celulose Bacteriana e Verificação da Cinética de Adsorção do Anticorpo inVitro**

O anticorpo anti-BMP-2 foi comprado comercialmente e imobilizado nas membranas de acordo com Freire et al.<sup>35</sup>.

O anticorpo foi diluído em solução salina (PBS) numa concentração de 25 µg/mL e incorporado por adsorção nas membranas de 25 mm de diâmetro por 24 horas.

#### **3.3.1 Estudos de adsorção e quantificação de anticorpos in vitro**

Para avaliar a adsorção dos anticorpos anti-BMP-2 nas membranas, os materiais contendo os anticorpos foram suspensos em 5 mL de PBS (pH = 7,4). Em vários períodos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias), a quantidade de anticorpo liberada foi detectada por anticorpos secundários anti-IgG de rato conjugados com FITC por meio de microscopia de imunofluorescência<sup>62</sup>. A análise de quantificação foi realizada por meio das fotografias capturadas pelo microscópio de fluorescência dos respectivos períodos e pelo uso do programa Image J.

### **3.4 Expressão Gênica**

Foram cultivadas  $5 \times 10^3$  células de calvária (pré-osteoblastos) de camundongos (MC3T3-E1) sobre cada material objeto de investigação em placas de 48 poços, além do Controle Negativo (sem material) e Controle Positivo (200ng/ml proteína BMP-2). As células foram cultivadas com 1 mL de meio osteogênico composto de: meio modificado de Dulbecco (DMEM) contendo SFB a 10% , penicilina–streptomicina (PS) a 1%, β-glicerofosfato 2M e ácido ascórbico 50ug/ml durante 7, 14 e 21 dias de contato do material. O meio de cultura foi mudado uma vez a cada três dias<sup>65</sup>.

Após o tratamento, as células MC3T3-E1 foram submetidas à extração do RNA total por meio de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. A concentração do RNA extraído de cada amostra foi medida por densidade óptica por meio do Nanodrop (ThermoScientific). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa utilizando o OligodT(20) com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas pelo sistema TaqMan (Applied Biosystems, Foster City), que é constituído por um par de primers e uma sonda marcada com um fluoróforo. O gene para controle endógeno da reação foi o Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (*GAPDH*, cat. nº Mm99999915\_g1), cujo nível de

expressão foi usado para normalizar a expressão dos genes de interesse: *SPPI* (Osteopontina; cat. n° Mm00436767\_m1), *ALPL* (Fosfatase Alcalina; cat. n° Mm00475834\_m1), *TNFRSF11B* (Osteoprotegerina; cat. n° Mm01205928\_m), *RUNX2* (RUNX; cat. n° Mm00501584\_m1), *BGLAP* (Osteocalcina; cat. n° Mm00649782\_gH) e *VEGF* (Fator de crescimento endotelial vascular; cat. n° Mm01281449\_m1).

Foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controlado endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes eram semelhantes e próximas a 100%. Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata a partir de: 6,25 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 2x, 0,625 µL da solução de primers e sonda (ensaio TaqMan), 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA (50 ng), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µL de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os valores da expressão gênica relativa dos genes de interesse foram analisados utilizando o software Expression Suite (Applied Biosystems®). O software utiliza o método comparativo  $C_t$  ( $\Delta C_t$ ) para quantificar com precisão a expressão gênica relativa dos genes analisados. Após normalização pela expressão do gene controle endógeno, os valores de expressão para cada gene alvo foram obtidos, sendo apresentados em gráficos os resultados do fold change ( $2^{-\Delta C_t}$ ).

A análise estatística foi realizada utilizando o Programa GraphPad Prism 5.01 e todos os testes estatísticos foram considerados ao nível de significância de 5%. Foram aplicadas a análise de variância (ANOVA) two-way, seguido do teste de Bonferroni.

### **3.5 Detecções da Formação de Nódulos Minerais por Coloração com Vermelho de Alizarina**

Para a avaliação da formação de nódulos de mineralização foram utilizadas  $5 \times 10^3$  células de calvária (pré-osteoblastos) de camundongos (MC3T3-E1) crescidas em 1 ml de meio osteogênico. As células foram semeadas em placas de petri de 90 mm x 15mm em contato com a membrana CB-HA-anti-BMP-2 durante o período de 7, 10 e 14 dias. As células MC3T3-E1 cultivadas sobre as placas de cultura celular foram lavadas com solução de PBS, fixadas em formaldeído 4% por 30 min, e lavadas na sequência com PBS. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina a 40 mM pH 4,2, a temperatura ambiente por 30 min. Para a avaliação quantitativa da formação de nódulos minerais, o corante foi diluído com solução de ácido acético 10% e hidróxido de amônia 10%. Posteriormente, 150 µl desta

solução foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância das amostras foi realizada por um espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com comprimento de onda de 405 nm .

### **3.6 Atividade da ALP**

A atividade de ALP foi avaliada utilizando  $5 \times 10^3$  células de calvária (pré-osteoblastos) de camundongos (MC3T3-E1) crescidas em placas de 48 poços com 1 ml de meio osteogênico em contato com a membrana CB-HA-anti-BMP-2 durante o período de 7, 10 e 14 dias de incubação, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). A absorbância da reação foi avaliada em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina, medida a partir da curva padrão usando a timolftaleína. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total, que foi determinado pelo método de Lowry. As proteínas foram extraídas inicialmente de cada poço adicionando-se 1 mL/poço de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma®) por 40 min em temperatura ambiente (TA). Uma quantidade de 100 µL da solução de Lowry (Sigma) foram adicionados a 150 µL das amostras e incubadas por 20 min, em temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 50 µL da solução de Folin & Ciocalteu's (Sigma) e incubadas por 30 min em temperatura ambiente. A absorbância foi avaliada a 595 nm utilizando espectrofotômetro (ELx 800, Bio-Tec). O conteúdo de proteína total foi então calculado através de curva padrão determinada a partir de albumina bovina e expresso em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **3.7 Quantificação da Produção de IL-6 e TGF-β por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

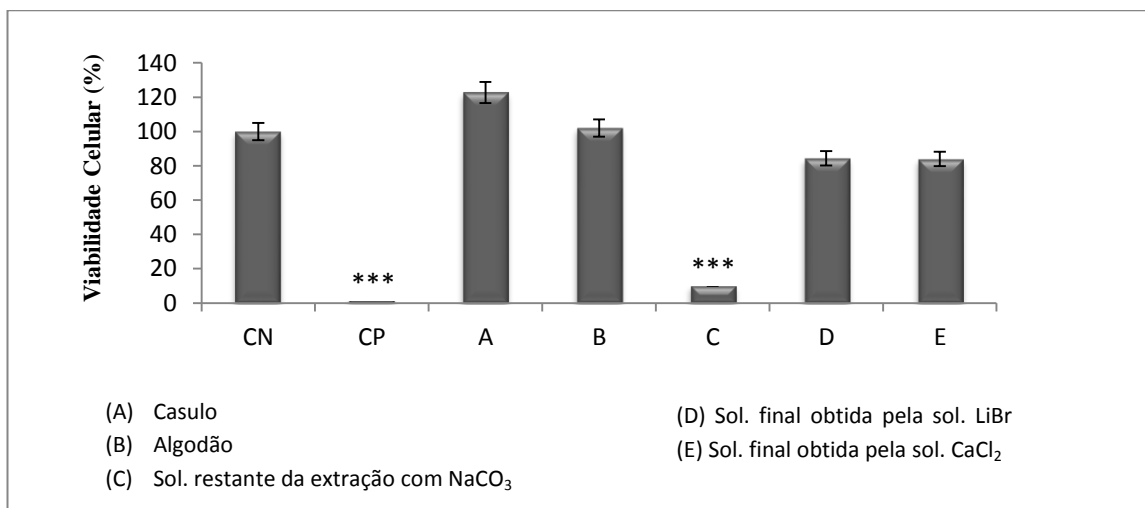
A produção de IL-6 e TGF-β foi quantificada nos sobrenadantes de culturas de células de linhagem MC3T3-E1 crescidas em contato com a membrana CB-HA-anti-BMP-2 durante o período de 7, 14 e 21 dias, coletados durante o ensaio de expressão gênica. Os limites de detecção mínimos foram 31,25 pg/mL para IL-6 e 15,625 pg/mL para TGF-β (R&D System – DuoSet ELISA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliações da Toxicidade da Fibroína: Ensaio de Citotoxicidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para Confirmação da Separação e Eliminação da Proteína Serecina

Considerando a viabilidade celular obtida no CN como valor referência, foi observada diferença significativa somente em relação à solução restante da extração do casulo com  $\text{NaCO}_3$  (solução C) ( $p < 0,0001$ ; Dunnett), pois continha serecina, demonstrando o potencial citotóxico da mesma (Figura 6).

Figura 6 -Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT.



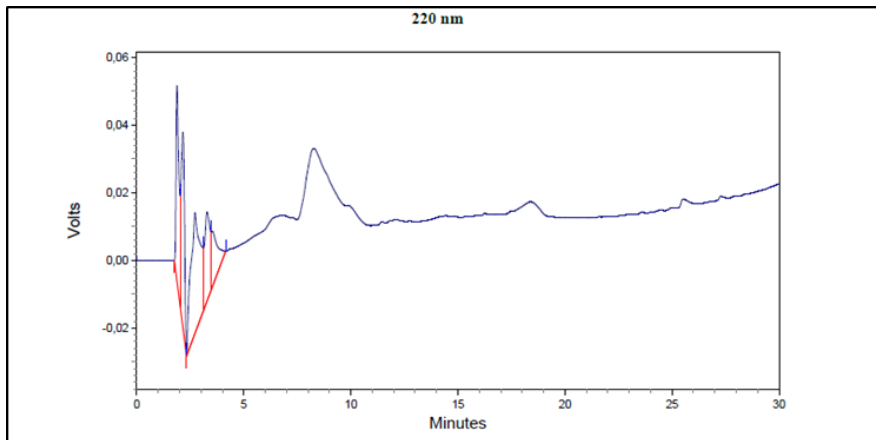
Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Por meio do estudo do CLAE, foi possível identificar dois picos na solução restante da extração do casulo com  $\text{NaCO}_3$  (Figura 7). O primeiro pico aparente em torno de 0,04 volts (eliminada em torno de 10 minutos de análise) é correspondente à proteína serecina, e o segundo pico menor em torno de 0,01 volts (eliminada em torno de 20 minutos de análise) é correspondente à proteína fibroína.

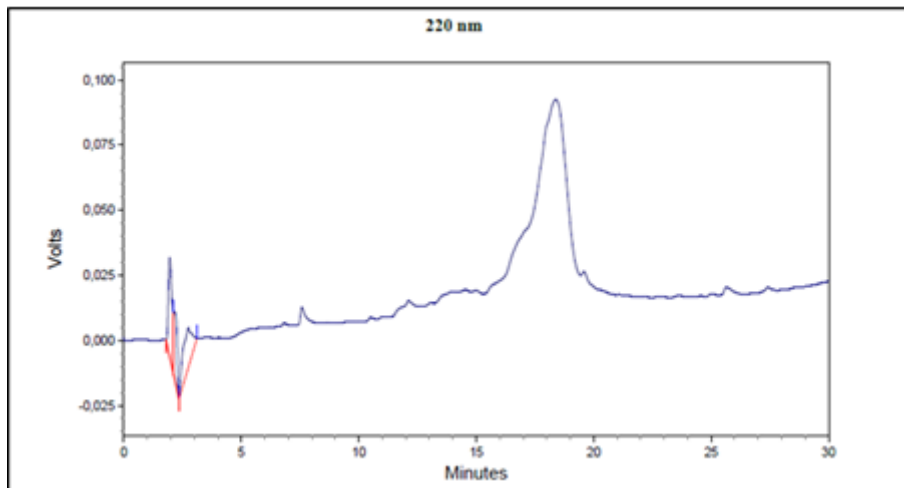
Figura 7 -CLAE da solução restante da extração do casulo com  $\text{NaCO}_3$ .



Fonte: Elaborado pela autora

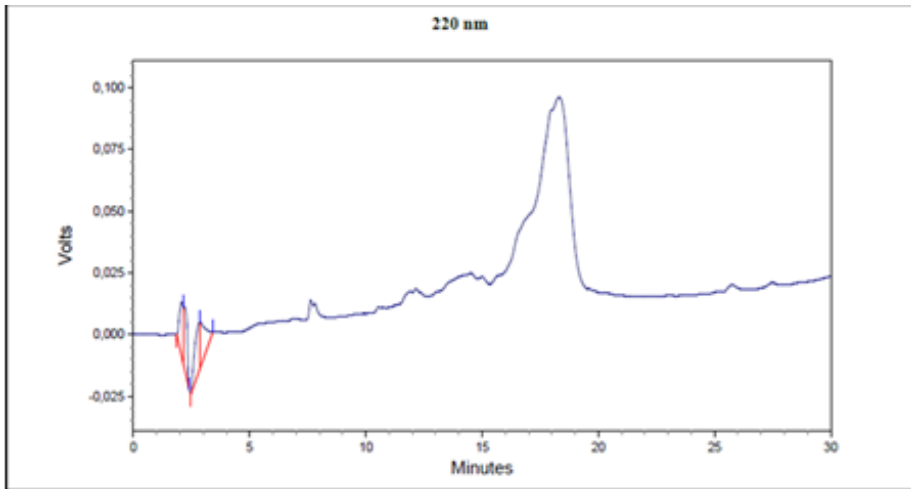
A análise de CLAE realizada nas soluções viscosas finais obtidas a partir das soluções de  $\text{LiBr}$  e de  $\text{CaCl}_2$  permite identificarmos a redução do primeiro pico de 0,04 para 0,01 volts e o aumento significativo do segundo pico de 0,01 para 0,1 volts, ou seja, a proteína sericina é praticamente eliminada da amostra e a proteína fibroína passa ser relativamente expressa, como pode ser visto nas Figuras 8 e 9, pelas soluções de  $\text{LiBr}$  e de  $\text{CaCl}_2$ , respectivamente.

Figura 8 -CLAE da solução viscosa final obtida a partir da solução de  $\text{LiBr}$ .



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 9 -CLAE solução viscosa final obtida a partir da solução de  $\text{CaCl}_2$ .



Fonte: Elaborado pela autora

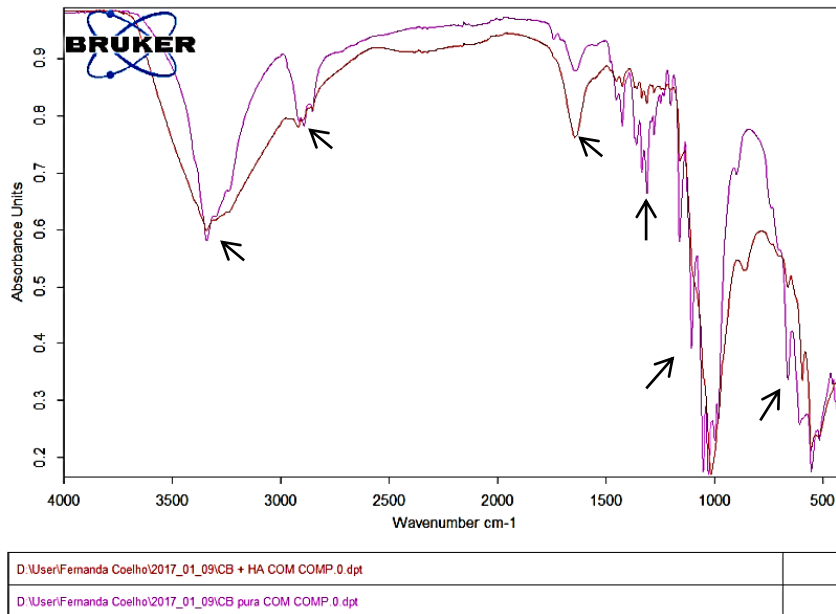
Esses estudos preliminares demonstraram que a extração da serecina foi realizada de forma efetiva, proporcionando a eficácia do processo de extração da proteína fibroína e o caráter não citotóxico da mesma pelo ensaio XTT.

## 4.2 Caracterização das Membranas

### 4.2.1 Análise dos grupos funcionais relacionados às fases de apatita precipitada nas membranas por FTIR

A Figura 10 apresenta espectros de infravermelho para as amostras CB e CB-HA.

Figura 10 -Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras CB e CB-HA.



Fonte: Elaborado pela autora

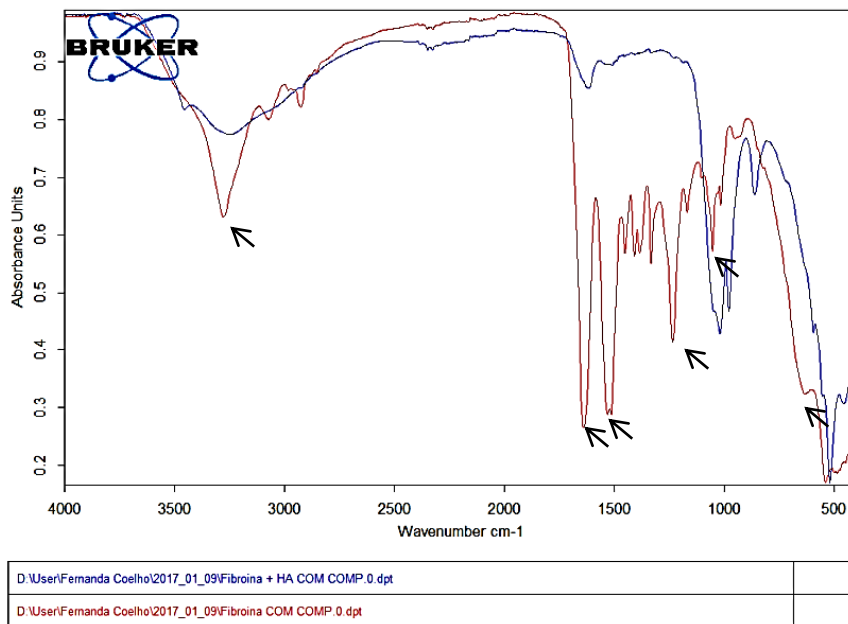
As principais atribuições que caracterizam a celulose são:  $\sim 3450\text{cm}^{-1}$  - estiramento OH;  $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$  - estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico  $\text{CH}_2$ ;  $2700\text{ cm}^{-1}$  - estiramento simétrico  $\text{CH}_2$ ;  $1645\text{ cm}^{-1}$  - deformação OH;  $1432\text{ cm}^{-1}$  - deformação  $\text{CH}_2$ ;  $\sim 1370\text{ cm}^{-1}$  - deformação  $\text{CH}_3$ ;  $\sim 1332\text{ cm}^{-1}$  - deformação OH e na região de  $1320 - 1030\text{ cm}^{-1}$  deformação  $\text{CO}^{56}$ .

As membranas de CB-HA apresentaram um espectro com bandas de fosfato típicas com estrutura de apatita. Bandas intensas foram observadas em  $1093, 1020, 962, 570-600\text{ cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento dos íons  $(\text{PO}_4^{3-})^{55, 63,64}$ . As bandas com intensidade baixa localizadas ao redor de  $1428$  e  $838\text{ cm}^{-1}$  correspondem ao estiramento de íons  $(\text{CO}_3^{2-})^{55}$ .

A banda de baixa intensidade em torno de  $3500-3200\text{ cm}^{-1}$  (estiramento OH) observado no espectro da CB sofreu um leve decréscimo na intensidade no espectro do compósito CB-HA, sugerindo possível interação dos cristais de HA com os grupos hidroxilas da celulose.

A Figura 11 apresenta espectros de infravermelho para as amostras FS e FS-HA.

Figura 11 -Espectro vibracional na região do infravermelho obtido das amostras FS e FS-HA.



Fonte: Elaborado pela autora

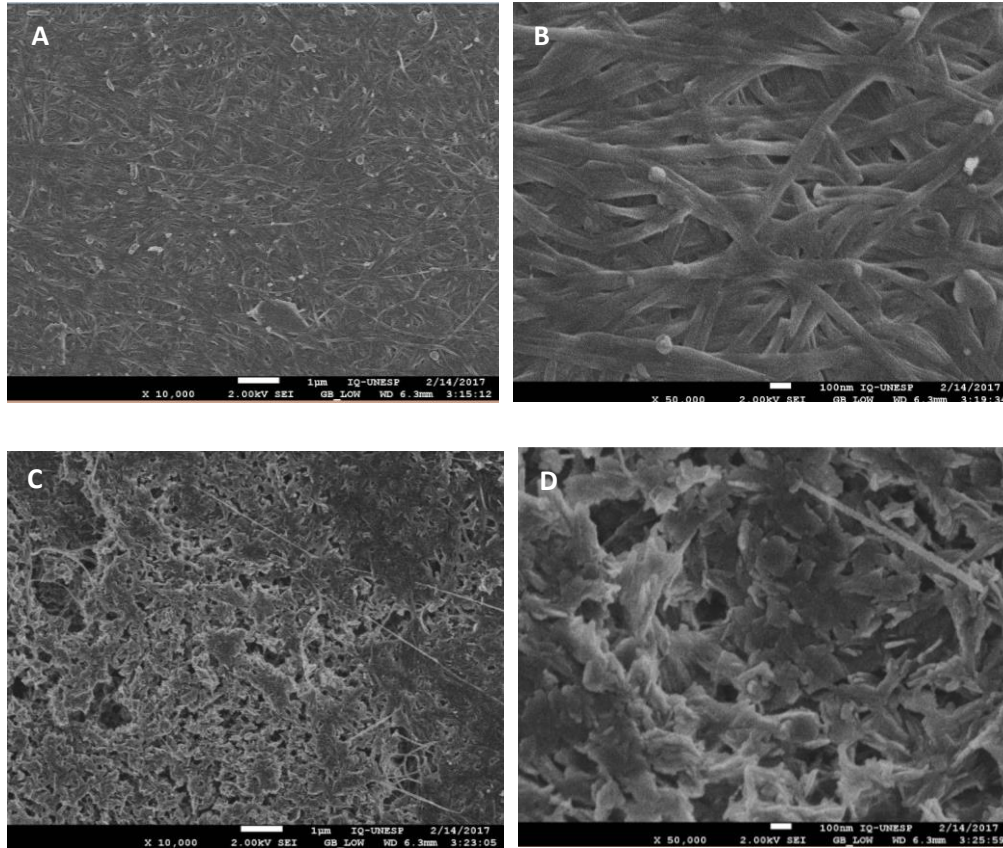
As principais atribuições que caracterizam a fibroína são: bandas de absorção em: 1643, 1598, e 1243, são característicos de bandas de amida I, amida II, amida III. A absorção das bandas em 1634 e 650  $\text{cm}^{-1}$  é característica das bandas de amida I e amida V. As bandas em 631 e 3470  $\text{cm}^{-1}$  pertencem à vibração da hidroxila. As bandas 1045 e 1091  $\text{cm}^{-1}$  são característicos das bandas de vibração de alongamento do fosfato, enquanto as bandas em 603 e 570  $\text{cm}^{-1}$  são devido à vibração de flexão de fosfato<sup>66</sup>.

A intensidade de vibração em 1072  $\text{cm}^{-1}$  diminuiu devido ao aumento de HA e, praticamente desapareceu devido à vibração do fosfato em 1045  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro de FS, a absorção da carbonila da amida em 1634  $\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à estrutura folha  $\alpha$ -hélice, enquanto no espectro de FS-HA essa banda diminuiu, o que sugere que a hidroxiapatita tenha revestido o filme de fibroína, impedindo a detecção dessa proteína pelo FTIR.

#### 4.2.2 Morfologia e estrutura dos respectivos compósitos bem como a análise dos cristais de apatita incorporado aos compósitos por MEV/EDS

A micrografia das superfícies das membranas CB-HA revelaram cristais de HA de ordem nanométrica recobrando as fibras da CB de forma homogênea e se observou também poros distribuídos regularmente na superfície da membrana (Figura 12).

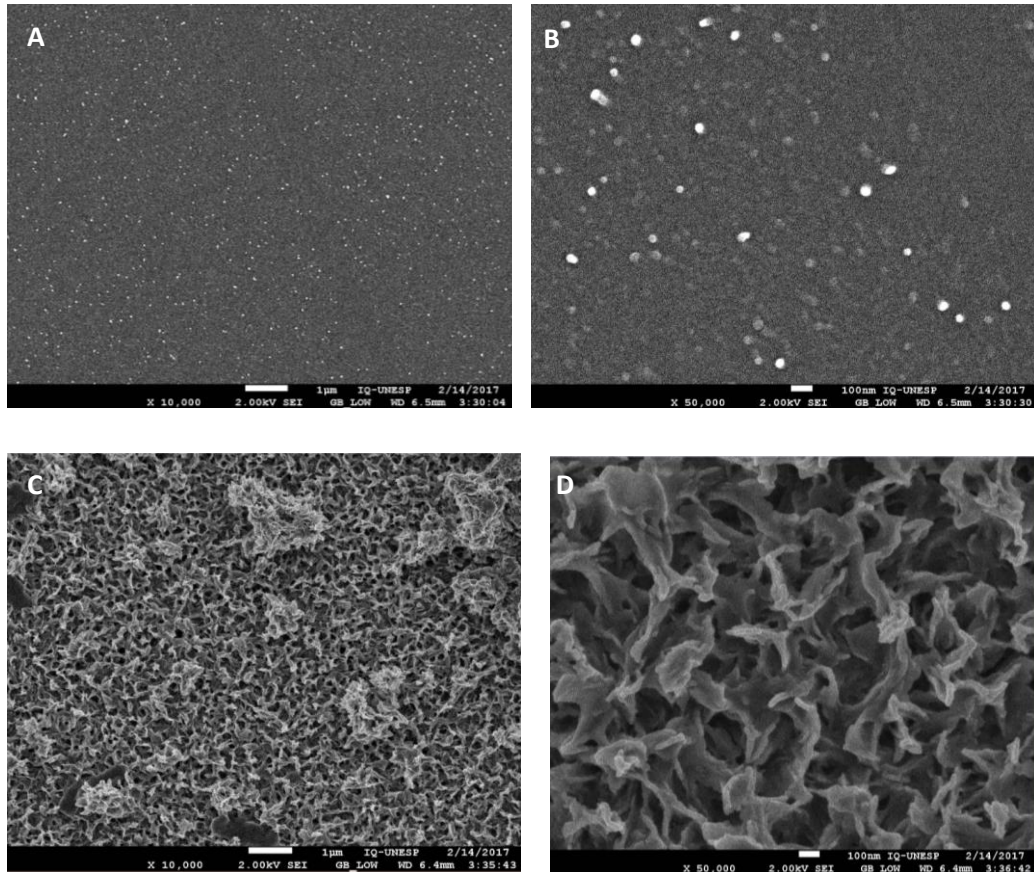
Figura 12 -Micrografia de MEV das membranas de CB e CB-HA: A. Superfície da CB, aumento 10x; B. Superfície da CB, aumento 50x; C. Superfície da CB-HA, aumento 10x; D, superfície da CB-HA, aumento 50x.



Fonte: Elaborado pela autora

A micrografia das superfícies das membranas FS-HA revelaram cristais de HA de ordem nanométrica recobrendo a superfície da FS de forma homogênea e se observou também que algumas regiões ocorreram uma deposição aumentada dos cristais (Figura 13).

Figura 13 -Micrografia de MEV das membranas de FS e FS-HA. A. Superfície da FS, aumento 10x; B. Superfície da FS, aumento 50x; C. Superfície da FS-HA, aumento 10x; D. Superfície da FS-HA, aumento 50x.



Fonte: Elaborado pela autora

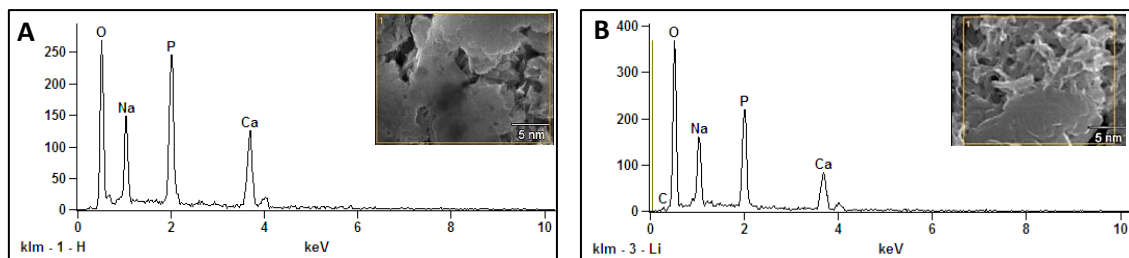
Os dados do EDS mostraram que as razões molares Ca/P qualitativamente mensuradas estão de acordo com a morfologia dos cristais de HA observados para as amostras CB-HA. De acordo com a Tabela 4, que mostra a ocorrência dos fosfatos de cálcio em sistemas biológicos, podemos concluir que o compósito CB-HA obteve uma razão molar Ca/P entre 1,49-1,54 com uma média de 1,52, dados estes referentes à hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) (Figura 14A). Nos compósitos FS-HA (Figura 14B) foi obtido uma razão molar Ca/P entre 1,28-1,32 com uma média de 1,30, podendo esta razão molar Ca/P ser referente a um fosfato octacálcio<sup>74</sup>.

Tabela 4 -Fosfatos de cálcio em sistemas biológicos. Fase da apatita, fórmula química e razão molar Ca/P.

Fase da apatita	Fórmula	razão molar Ca/P
fosfato dicálcio (monetita) - DCP	$\text{CaHPO}_4$	1,0
fosfato dicálcio dihidratado (brushita) - DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
pirofosfato de cálcio - CPP	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
fosfato octacálcio - (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
fosfato de cálcio amorfo - (ACP)	-----	1,40 - 1,50
$\alpha$ e $\beta$ -fosfato tricálcio - ( $\alpha$ e $\beta$ -TCP)	$(\text{Ca})_9(\text{PO}_4)_6$	1,48
hidroxiapatita deficiente em cálcio - (CDHA)	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	1,52
hidroxiapatita - (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67

Fonte: Stephen et al.<sup>66</sup>.

Figura 14 -Espectro de EDS para as amostras CB-HA (A) e FS-HA (B).



Fonte: Elaborado pela autora

### 4.2.3 Propriedades mecânicas dos compósitos relacionadas à resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade.

#### 4.2.3.1 Determinação da espessura das membranas

A espessura é fator que influencia várias propriedades das membranas de revestimento. McHugh et al.<sup>67</sup> observaram que o aumento da espessura de membranas levou a maior resistência à transferência de massa através delas e, conseqüentemente, o equilíbrio parcial de pressão de água na superfície mais interna da membrana também aumentou.

Os valores de espessura média das membranas avaliadas estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 -Espessura das membranas (média  $\pm$  desvio padrão; n=5).

<b>Membranas</b>	<b>Espessura (mm) <math>\pm</math> DP</b>
CB seca	0,03228 $\pm$ 0,017
CB+HA seca	0,0484 $\pm$ 0,009
FS seca	0,0484 $\pm$ 0,010
FS+HA seca	0,189 $\pm$ 0,060
CB úmida	0,0312 $\pm$ 0,005
CB+HA úmida	0,0694 $\pm$ 0,004
FS úmida	0,0722 $\pm$ 0,008
FS+HA úmida	0,09224 $\pm$ 0,003

Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados revelaram que a incorporação de HA nas membranas aumentou a espessura somente da membrana FS seca em relação à FS+HA seca ( $p < 0,0001$ ; Teste de Tukey). Além disso, das membranas que foram umedecidas na solução SBF, somente a FS+HA úmida apresentou uma diferença significativa na espessura em relação às respectivas membranas secas ( $p < 0,0001$ ; Teste de Tukey).

#### 4.2.3.2 Propriedades mecânicas dos membranas

Durante os testes de resistência mecânica, um suporte metálico se move em velocidade constante em direção ao centro da membrana até que ocorra a ruptura. Inicialmente, ocorre uma deformação elástica, na qual a tensão é proporcional à deformação, seguida da deformação plástica e, após um ponto de cedência, dá-se a ruptura da membrana<sup>68</sup>.

Os resultados do teste de resistência mecânica das membranas estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 -Propriedades mecânicas das membranas.

<b>Membranas</b>	<b>(R<sub>p</sub>) (MPa)</b>	<b>(A<sub>p</sub>) (%)</b>	<b>(E<sub>p</sub>) (k J m<sup>3</sup>)</b>
CB seca	16,075 ± 0,721	0,942 ± 0,568	415,949 ± 48,248
CB+HA seca	6,812 ± 3,229	0,622 ± 0,223	234,205 ± 31,598
FS seca	2,388 ± 0,261	0,086 ± 0,088	22,755 ± 8,265
FS+HA seca	2,078 ± 0,768	0,086 ± 0,008	23,522 ± 9,898
CB úmida	23,465 ± 3,756	0,709 ± 0,111	670,067 ± 18,113
CB+HA úmida	7,888 ± 0,396	0,529 ± 0,200	148,875 ± 4,934
FS úmida	2,016 ± 0,170	1,824 ± 0,127	144,757 ± 15,508
FS+HA úmida	1,403 ± 0,111	2,010 ± 0,035	70,731 ± 5,788

R<sub>p</sub>: resistência à perfuração; A<sub>p</sub>: alongamento durante a perfuração; E<sub>p</sub>: energia na perfuração por unidade de volume.

Fonte: Elaborado pela autora

Para todas as amostras foi possível verificar que a presença da hidroxiapatita nas membranas tanto avaliada seca como úmida mostraram-se menos resistentes mecanicamente (menores valores de R<sub>p</sub>) e diferentes significativamente em relação às membranas sem hidroxiapatita (p<0,0001; Tukey).

Os resultados de E<sub>p</sub> estão de acordo com os de R<sub>p</sub> para as membranas de celulose bacteriana, uma vez que as membranas que exibiram maior gasto de energia na perfuração foram as mesmos que mostraram maior R<sub>p</sub>, enquanto as membranas com menor R<sub>p</sub> apresentaram também os menores valores para E<sub>p</sub>. No entanto, para as membranas de fibroína, os resultados não mostram-se coerentes.

O alongamento durante a perfuração (A<sub>p</sub>) mede a plasticidade das membranas, ou seja, sua capacidade de extensão antes da ruptura<sup>69</sup>. Os valores de A<sub>p</sub> não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p>0,05; Tukey).

Baseados nestes resultados, conclui-se que os parâmetros utilizados (R<sub>p</sub>, E<sub>p</sub> e A<sub>p</sub>) para avaliar a propriedade mecânica das membranas de CB aumentaram quando as mesmas foram umedecidas. Isso revela que as membranas tornaram-se menos frágeis, possuindo um tempo de permanência maior in vivo.

#### 4.2.4 Teste de ângulo de contato para determinar as propriedades hidrofílicas dos compósitos antes e após a imobilização dos anticorpos anti-BMP-2 (AC).

Os valores para o ângulo de contato para os materiais CB, CB+HA, FS, FS+HA, CB+AC, CB+HA+AC, FS+AC, FS+HA+AC estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 -Valores mensurados para o ângulo de contato para as amostras CB, CB+HA, FS, FS+HA, CB+AC, CB+HA+AC, FS+AC, FS+HA+AC.

Membranas	Ângulo de Contato $\pm$ DP
CB	15,26 $\pm$ 0,45
CB+HA	2,1 $\pm$ 0,36
FS	53,6 $\pm$ 0,60
FS+HÁ	56,73 $\pm$ 1,16
CB+AC	5,13 $\pm$ 0,20
CB+HA+AC	0,58 $\pm$ 0,51
FS+AC	32,19 $\pm$ 0,34
FS+HA+AC	35,59 $\pm$ 0,71

Fonte: Elaborado pela autora

As medidas de ângulo de contato para as amostras CB, CB+HA, FS, FS+HA, CB+AC, CB+HA+AC, FS+AC, FS+HA+AC revelaram que todas as superfícies destas amostras apresentaram-se hidrofílicas por possuírem um ângulo de contato  $\theta < 90^\circ$ . No entanto, é possível observar que a presença dos AC nas amostras CB+AC, CB+HA+AC, FS+AC, FS+HA+AC diminui ainda mais este ângulo, o que deixou as amostras levemente mais hidrofílicas.

### 4.3 Ensaios in Vitro para Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

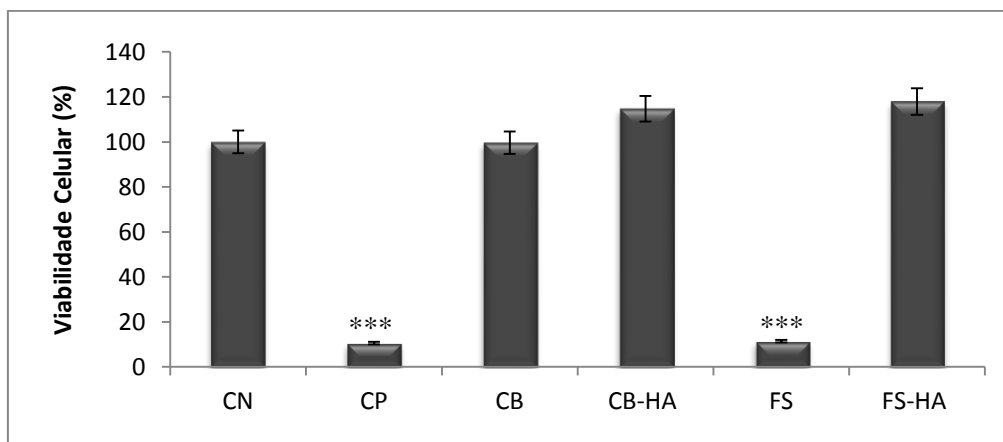
#### 4.3.1 Ensaio in vitro para a linhagem de células CHO-K1

##### 4.3.1.1 Testes de citotoxicidade

### Ensaio XTT

Após 24 horas de contato dos materiais com células CHO-K1, a viabilidade celular foi acessada pelo Kit XTT, considerando o controle negativo como valor referência, e demonstrou que a maioria dos materiais testados apresentou alta viabilidade celular (mínimo de 100%), tendo sido maiores ou semelhantes ao controle negativo, exceto para o FS. Considerando o teste de Dunnett, o qual toma como referência o CN, foi observada diferença significativa para CP e FS ( $p < 0,001$ ) (Figura 15).

Figura 15 -Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT.



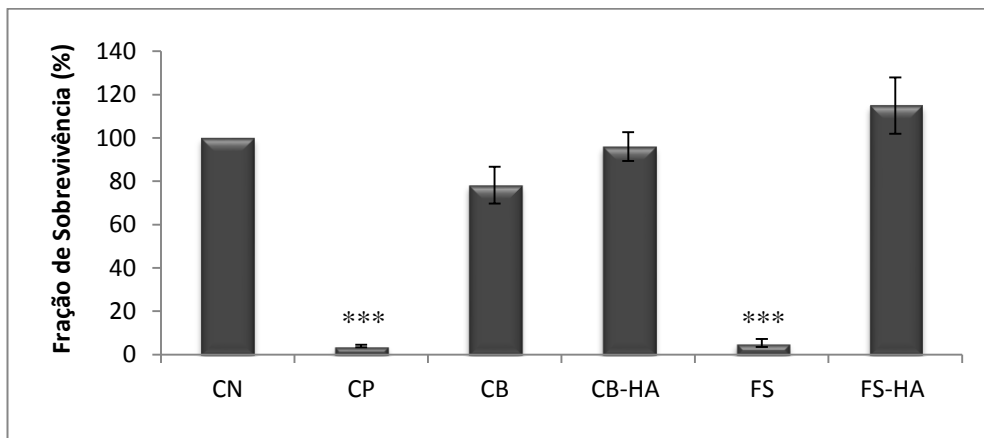
Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

### Sobrevivência Clonogênica

Considerando os resultados da Fração de Sobrevivência, o material FS apresentou fração de sobrevivência significativamente diferente do CN (Figura 16), o que indica um comprometimento na capacidade proliferativa das células. Já os materiais CB, CB-HA, FS-HA não mostraram fração de sobrevivência estatisticamente diferente do CN ( $p > 0,05$ ; Dunnett).

Figura 16 -Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica.



Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

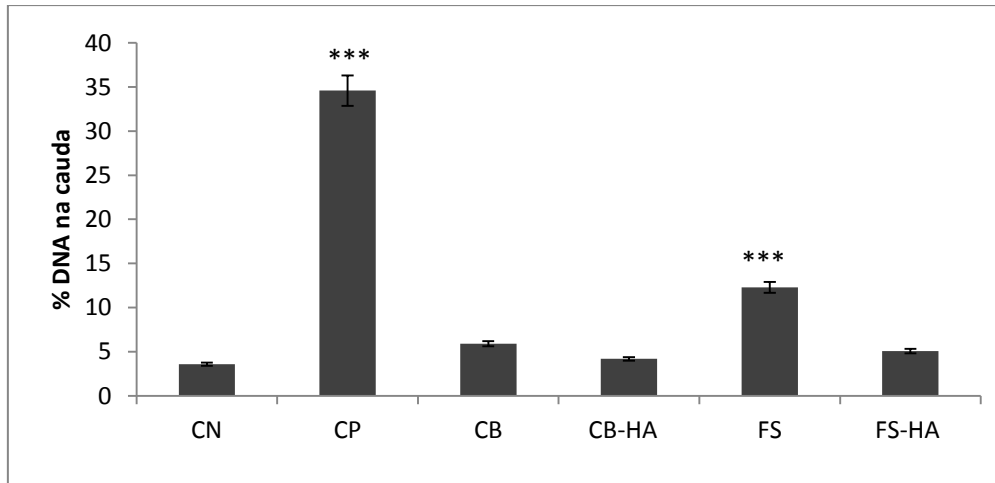
Analisando conjuntamente os dois testes realizados para investigar a citotoxicidade (XTT e Sobrevivência Clonogênica), pode-se observar concordância em ambos em relação aos materiais CB, CB-HA, FS-HA, além de não serem citotóxicos, apresentaram maior viabilidade celular no teste XTT e não prejudicaram a capacidade proliferativa das células observada pelo teste de Sobrevivência Clonogênica. Porém, o contrário foi observado para o material FS, que além de possuir uma citotoxicidade significativa (XTT), demonstrou também comprometer significativamente a capacidade proliferativa das células (Sobrevivência Clonogênica).

#### 4.3.1.2 Teste de genotoxicidade

##### Ensaio Cometa

Analisando a porcentagem de DNA na cauda (Figura 17), pode ser observado que o material FS foi genotóxico. Já os demais materiais não apresentaram genotoxicidade, pois não mostraram diferença estatisticamente significativa em relação ao CN.

Figura 17 -Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa.

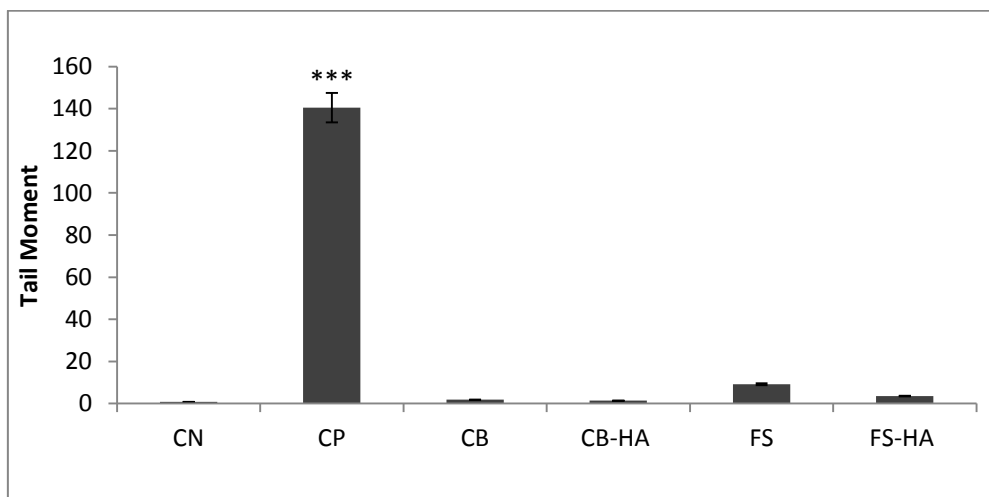


Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a análise de genotoxicidade pelo Tail Moment (Figura 18), pode ser observado que nenhum material foi genotóxico.

Figura 18 -Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa.



Colunas indicam o valor médio de Tail Moment. Barras indicam o erro padrão. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

### 4.3.1.3 Teste de mutagenicidade

#### Teste de Micronúcleo

Complementando a análise de genotoxicidade, foi realizado teste de mutagenicidade por meio do ensaio do Micronúcleo, de modo que os resultados podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN), Frequência de Micronúcleos (FMN), Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e Brotos obtidos de cada tratamento com os materiais e controles.

Grupo	IDN Média±EP	FBMN Média±EP	FMN Média±EP	PN Média±EP	Brotos Média±EP
CN	1,88 ± 0,004	13,00 ± 0,730	15,00 ± 0,966	3,00 ± 0,361	4,33 ± 0,760
CP	1,80 ± 0,005	107,00 ± 1,673***	161,3 ± 2,789***	34,67 ± 0,918***	25,67 ± 1,874***
CB	1,88 ± 0,024	20,00 ± 0,730	23,67 ± 0,210	6,33 ± 0,557	5,66 ± 0,557
CB-HÁ	1,84 ± 0,009	15,00 ± 0,730	15,67 ± 0,557	5,33 ± 1,054	4,66 ± 0,210
FS	1,85 ± 0,006	25,33 ± 2,011**	28,00 ± 1,317**	4,00 ± 0,365	5,33 ± 0,760
FS-HÁ	1,80 ± 0,012	12,33 ± 0,210	13,33 ± 0,210	3,33 ± 0,557	3,33 ± 0,210

Valores apresentados da média e erro padrão (EP). \*\* =  $p < 0,001$ , \*\*\* =  $p < 0,0001$ , em relação à CN. Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

Pelo teste ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa para o Índice de Divisão Nuclear (IDN) entre os materiais testados, mostrando que o processo de divisão celular foi uniforme para todos os tratamentos.

Na avaliação de células binucleadas com micronúcleos (FBMN), somente o material FS e o CP demonstraram diferença significativa em relação ao CN ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,0001$ ; Dunnett).

Um número elevado de micronúcleos (FMN) foi observado no material FS, que foi estatisticamente diferente do CN ( $p < 0,001$ ; Dunnett). Não foram verificadas diferenças significativas entre os outros materiais avaliados em relação ao CN.

Em relação à PN e Brotos, apenas o CP foi estatisticamente diferente do CN ( $p < 0,0001$ ; Dunnett).

### 4.3.2 Ensaio in vitro para a linhagem de células MC3T3-E1

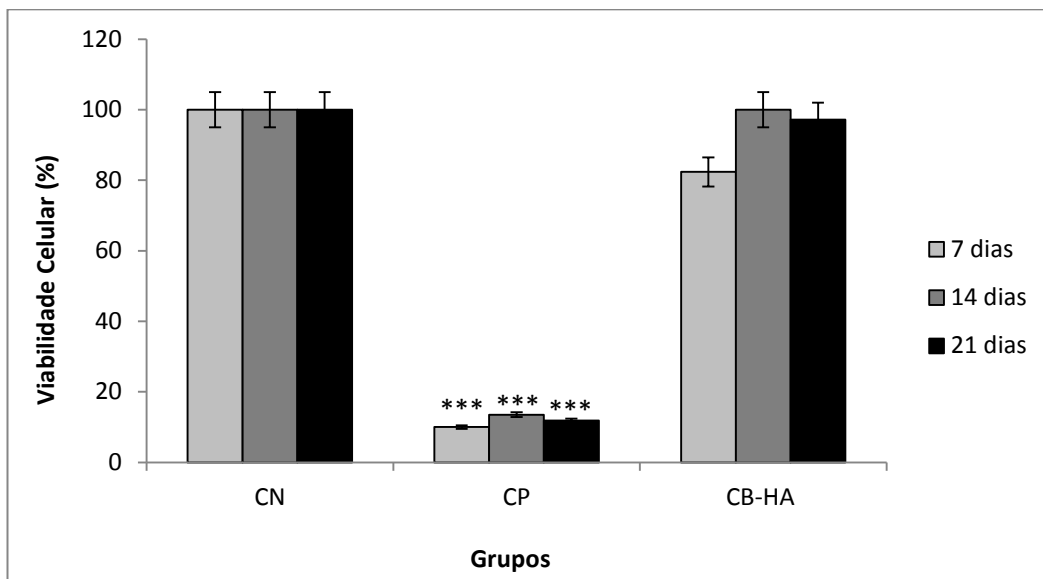
#### 4.3.2.1 Testes de citotoxicidade

##### Ensaio XTT

A análise de citotoxicidade pelo método XTT, o qual avalia a viabilidade celular, foi realizada por 7, 14 e 21 dias de contato do material CB-HA com as células MC3T3-E1. As membranas de FS-HA deixaram de ser estudada devido a toxicidade apresentada na linhagem CHO-K1 e devido a razão molar de Ca/P nos cristais de apatita ter sido muito inferior em comparação a razão molar encontrada na hidroxiapatita.

Considerando a viabilidade celular obtida do Controle Negativo como valor referência, pode-se observar que o material CB-HA mostrou com alta viabilidade celular para os três períodos avaliados, tendo sido semelhante ao CN. Considerando o teste de Dunnett, o qual toma como referência o CN, foi observada somente diferença significativa em relação ao CP ( $p < 0,001$ ) (Figura 19).

Figura 19 -Citotoxicidade (viabilidade celular) avaliada pelo método XTT.



Colunas indicam o valor médio da viabilidade celular. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

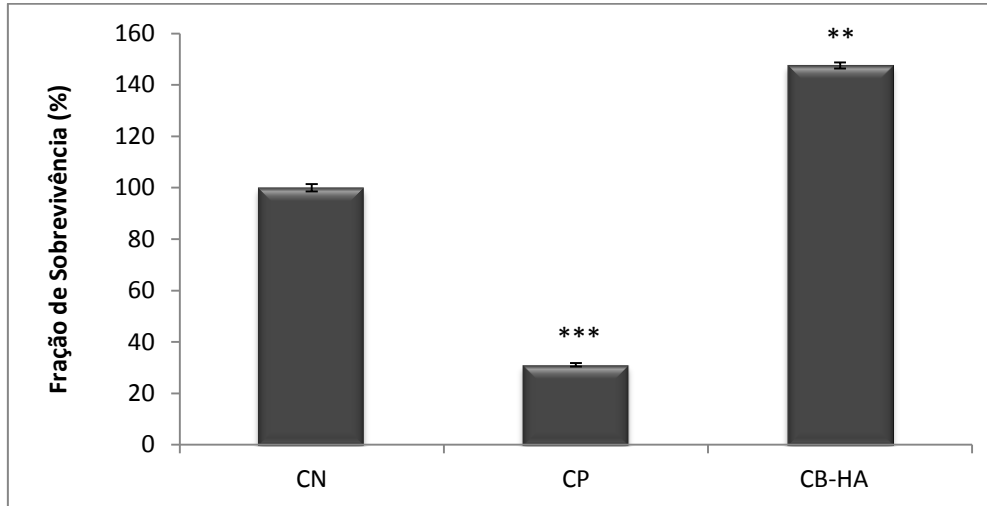
Fonte: Elaborado pela autora

##### Sobrevivência Clonogênica

Considerando os resultados da Fração de Sobrevivência, o material CB-HA apresentou fração de sobrevivência significativamente diferente do CN (Figura 20), no entanto, essa

diferença foi decorrente de uma melhora na capacidade proliferativa das células ( $p < 0,001$ ; Dunnett.).

Figura 20 -Citotoxicidade avaliada pela Sobrevivência Clonogênica.



Colunas indicam o valor médio da Fração de Sobrevivência (%). CN representa 100% de fração de sobrevivência. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN (\*\*\*) ( $p < 0,0001$ ) (\*\* =  $p < 0,001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

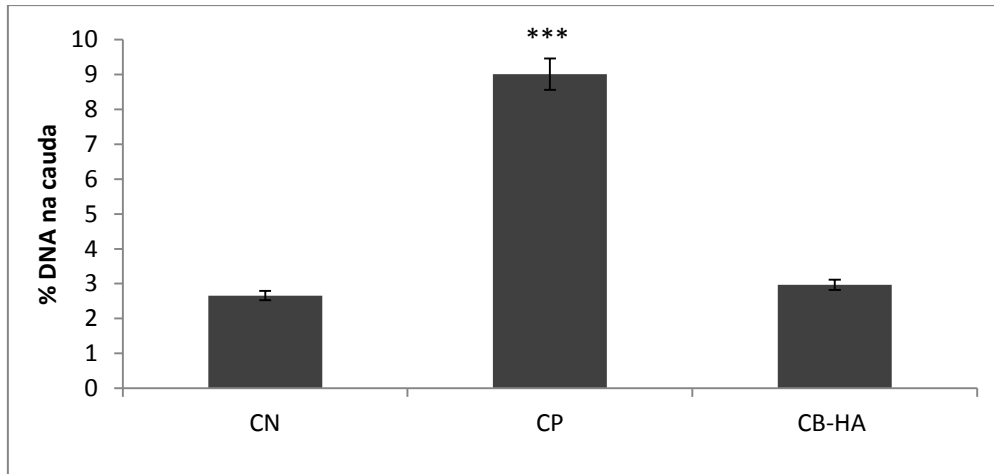
Analisando conjuntamente os dois testes realizados para investigar a citotoxicidade (XTT e Sobrevivência Clonogênica), pode-se observar concordância em ambos em relação ao material CB-HA que além de não ser citotóxico, demonstrou melhorar a capacidade proliferativa das células observado pelo teste de Sobrevivência Clonogênica.

#### 4.3.2.2 Teste de genotoxicidade

##### Ensaio Cometa

Analisando a porcentagem de DNA na cauda (Figura 21), pode ser observado que o material CB-HA não foi genotóxico em relação ao CN ( $p > 0,05$ ; Dunnett).

Figura 21 -Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa.

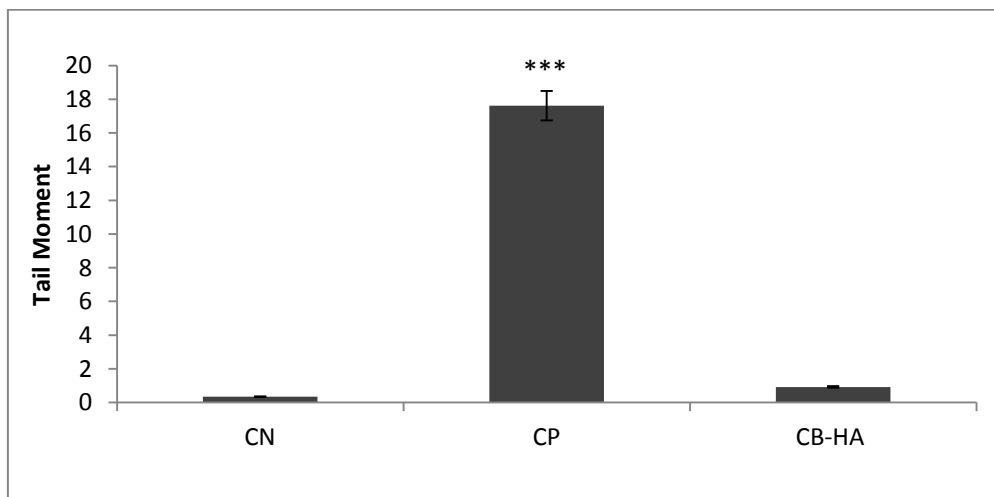


Colunas indicam o valor médio da porcentagem de DNA encontrado na cauda dos nucleóides. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a análise de genotoxicidade pelo Tail Moment (Figura 22), pode ser observado que o material CB-HA não foi genotóxico ( $p > 0,05$ ; Dunnett).

Figura 22 -Genotoxicidade avaliada pelo Ensaio Cometa.



Colunas indicam o valor médio de Tail Moment. Barras indicam o erro padrão. O símbolo \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação à CN ( $p < 0,0001$ ). Teste de Dunnett.

Fonte: Elaborado pela autora

### 4.3.2.3 Teste de mutagenicidade

#### Teste de Micronúcleo

Complementando a análise de genotoxicidade, foi realizado teste de mutagenicidade por meio do ensaio do Micronúcleo, de modo que os resultados podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 9 -Índice de Divisão Nuclear (IDN), Frequência de Células Binucleadas com Micronúcleo (FBMN), Frequência de Micronúcleos (FMN), Pontes Nucleoplasmáticas (PN) e Brotos obtidos de cada tratamento com os materiais e controles.

Grupo	IDN Média±EP	FBMN Média±EP	FMN Média±EP	Ponte Média±EP	Brotos Média±EP
CN	1,68 ± 0,005	9,33 ± 0,919	11,00 ± 0,632	3,00 ± 0,365	4,33 ± 0,760
CP	1,57 ± 0,005*** <sup>b</sup>	56,00 ± 1,317*** <sup>a</sup>	95,3 ± 2,565*** <sup>a</sup>	19,33 ± 0,918*** <sup>a</sup>	13,67 ± 0,431*** <sup>a</sup>
CB-HA	1,66 ± 0,008	15,33 ± 0,55	17,00 ± 0,365	5,33 ± 0,557	3,66 ± 0,210

Valores apresentados da média e erro padrão (EP). A letra <sup>a</sup> indica diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ( $p < 0,0001$ ), Dunnett. <sup>b</sup> =  $p < 0,0001$ , Tukey.

Fonte: Elaborado pela autora

Pelo teste ANOVA, o processo de divisão celular, verificado pelo Índice de Divisão Nuclear (IDN) não foi uniforme apenas para o CP em relação ao CN, sendo observado o efeito citostático do cloridrato de doxorrubicina ( $p < 0,0001$ ; Tukey)

O IDN é um marcador de proliferação celular em culturas e pode ser considerado uma medida de citotoxicidade geral. Considera-se a hipótese de que as células sob o efeito de agentes mutagênicos sofrem danos no DNA, não podem sobreviver ao ciclo de divisão celular e entram em um processo de necrose ou apoptose antes do término da primeira divisão. Também pode haver uma indução de atraso mitótico que, por não permitir a reparação de lesões genotóxicas, irá modificar o número de células entrando em mitose, modificando a proporção de células mono, bi, tri e tetranucleadas. Assim, há um IDN menor devido ao menor número de células se dividindo. Ainda, há a hipótese de um efeito clastogênico de agentes mutagênicos com ação aneugênica, induzindo algum grau de bloqueio do ciclo celular. Portanto, mais células não irão se dividir e o IDN continuará sendo baixo<sup>70</sup>.

Apesar do IDN ter sido relativamente menor no CP para a linhagem MC3T3-E1, esse fator não impediu a continuidade da avaliação dos resultados, pois de acordo com Fenech<sup>45</sup>,

para a análise de micronúcleos, as culturas devem apresentar um percentual de células binucleadas acima de 35%. Neste experimento, o material testado, assim como os controles, possuíram um percentual de células binucleadas acima de 55%, permitindo a leitura dos outros parâmetros.

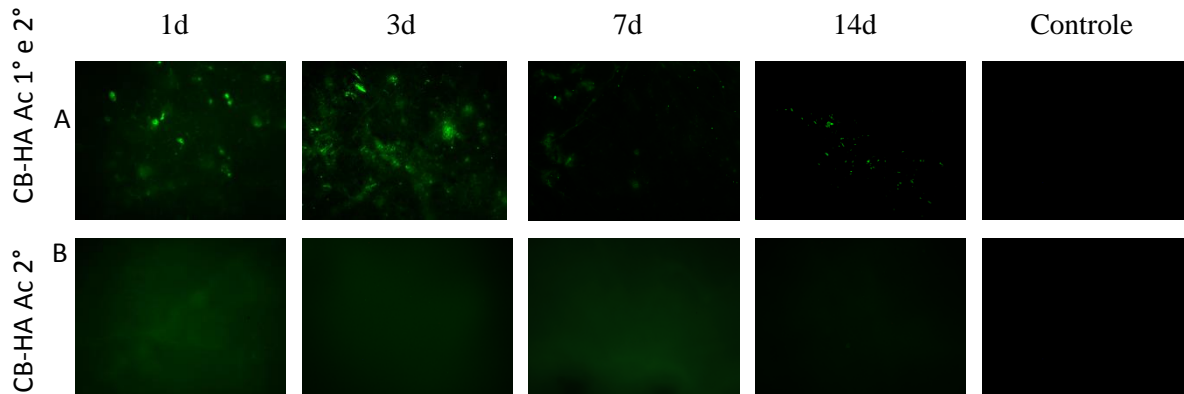
Na avaliação de células binucleadas com micronúcleos (FBMN), frequência de micronúcleos (FMN), PN e Brotos, apenas o CP foi estatisticamente diferente do Controle Negativo ( $p < 0,0001$ ; Dunnett).

Logo, pode-se concluir que o material CB-HA não demonstrou potencial mutagênico em nenhum dos parâmetros avaliados para a linhagem de MC3T3-E1.

#### **4.4 Estudos de Adsorção de Anticorpos in Vitro**

Um estudo de adsorção *in vitro* foi realizado para examinar possíveis diferenças na ligação dos anticorpos monoclonais (mAb) anti-BMP-2 nas membranas de CB (Figura 23). Os resultados demonstraram visualmente que imediatamente após a imobilização de mAb anti-BMP-2, os níveis do anticorpo detectados estavam elevados. Após 2 semanas de incubação, o mAb anti-BMP-2 foi observado até 14 dias. A retenção e liberação de mAb provavelmente será diferente *in vivo*, no entanto, esse estudo permitiu confirmar a adsorção dos anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nas membranas.

Figura 23 -Caracterização do perfil de adsorção in vitro de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nas membranas de CB.

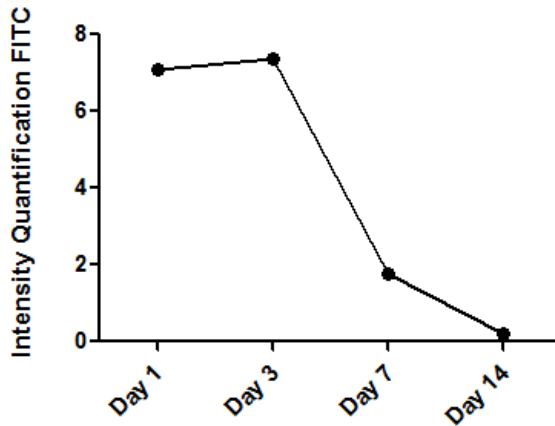


(A) Análise microscópica de fluorescência demonstrando na primeira linha a ligação do anticorpo primário anti-BMP-2 na membrana CB-HA detectado por anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias). A segunda linha mostra as membranas CB-HA apenas com anticorpos secundários. A última coluna mostra o Controle (CB-HA) sem nenhum tipo de anticorpo ligado. (B) Análise microscópica de fluorescência na membrana CB-HA inoculadas apenas por anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC em diferentes intervalos de tempo (1, 3, 7 e 14 dias). O dia 1 representa a detecção de ligação de anti-BMP-2mAb imediatamente após a imobilização do mAb na membrana CB-HA, confirmando que o mAb de camundongo é mantido em todos por até duas semanas in vitro.

Fonte: Elaborado pela autora

A Figura 24 representa a análise quantitativa de imunofluorescência de membranas com mAb anti-BMP-2 imobilizado nas membranas de CB-HA. As membranas foram fotografadas após o contato do anti-BMP-2 primário por 1,3 7 e 14 dias e após detectado por anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC.

Figura 24 -Caracterização do perfil de adsorção in vitro de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nas membranas de CB-HA.



Análise quantitativa de imunofluorescência de membranas com mAb anti-BMP-2 imobilizado do dia 1° ao dia 14° após a adsorção.

Fonte: Elaborado pela autora

Por meio das imagens capturadas pelo microscópio de fluorescência no período analisado e pela quantificação da intensidade realizada pelo software ImageJ, foi possível confirmar a ligação dos anticorpos primários anti-BMP-2 nas membranas de CB-HA. Além disso, foi possível verificar que a presença deles diminui gradativamente com o passar dos dias, reduzindo aproximadamente de 70% em 7 dias e de 90% em 14 dias.

#### 4.5 Expressão Gênica

A análise de expressão gênica foi realizada em cada material objeto de investigação, após o cultivo celular das células MC3T3-E1 em meio osteogênico pelo período de 7, 14 e 21 dias. Na Tabela 10 estão apresentados os materiais testados.

Os grupos: G2, G4 e G5 tiveram a troca da proteína BMP-2 (200 ng/ml) duas vezes por semana, juntamente com o meio de cultura  $\alpha$ -MEM<sup>65</sup>. A eficiência de amplificação de todos os genes foram semelhantes e próximos a 100%.

Foi verificado o nível de expressão dos genes *SPPI*, *ALPL*, *TNFRSF11B*, *RUNX2*, *BGLAP* e *VEGF*, os quais foram normalizados pelo gene selecionado como controle endógeno *GAPDH*, utilizando o software Expression Suite (Applied Biosystems®).

Tabela 10 -Materiais avaliados no Ensaio de Expressão Gênica

<b>Células MC3T3-E1 (G1) - CN</b>
<b>Células MC3T3-E1 + 200ng/ml proteína BMP-2 (G2)- CP</b>
<b>Células MC3T3-E1 + CB-HA-antiBMP-2 (G3)</b>
<b>Células MC3T3-E1 + CB-HA-antiBMP-2 + 200ng/ml de proteína BMP-2 (G4)</b>
<b>Células MC3T3-E1 + CB-HA + 200ng/ml de proteína BMP-2 (G5)</b>

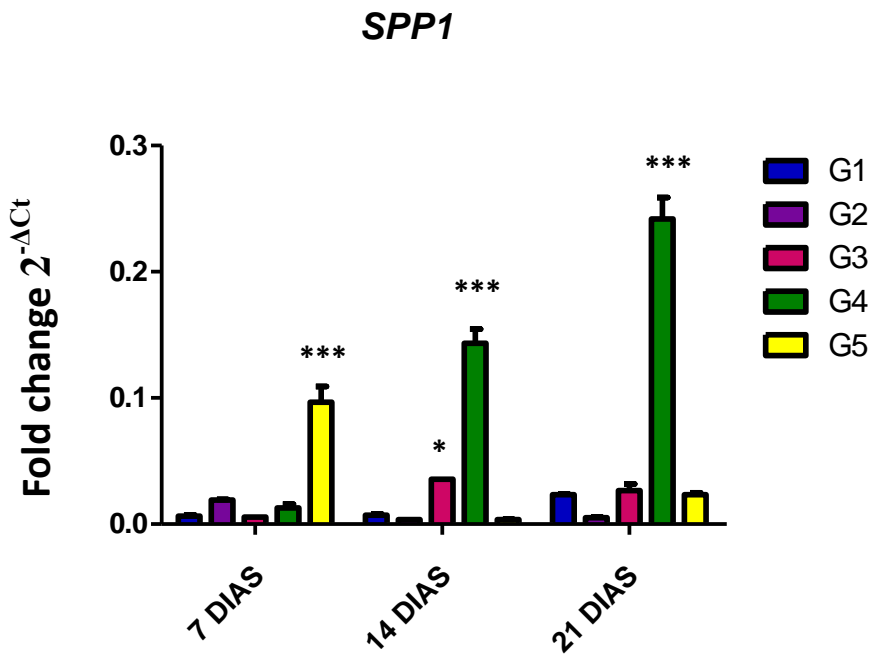
Fonte: Elaborado pela autora

O grupo G1 demonstra o quanto expressa constitutivamente cada gene em meio osteogênico. O grupo G2 representa o CP por conter o estímulo da proteína BMP-2 sobre as células em meio osteogênico. O grupo G3 representa a influencia, somente da membrana, sobre as células. O grupo G4 representa a estratégia AMOR nas membranas confeccionadas sobre as células. E o grupo G5 demonstra se a ausência da imobilização dos anticorpos reflete na expressão dos genes avaliados sobre as células.

A Figura 25 apresenta a análise quantitativa de RT-qPCR dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 14 e 21 após cultivo celular em MC3T3-E1 para cada um dos genes *SPP1*, *ALPL*, *TNFRSF11B*, *RUNX2*, *BGLAP* e *VEGF*.

Figura 25 -Análise quantitativa de RT-qPCR dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 14 e 21 após cultivo celular dos genes *SPP1* (A), *ALPL* (B), *TNFRSF11B* (C), *RUNX2* (D), *BGLAP* (E), e *VEGF* (F). (Continua)

A



B

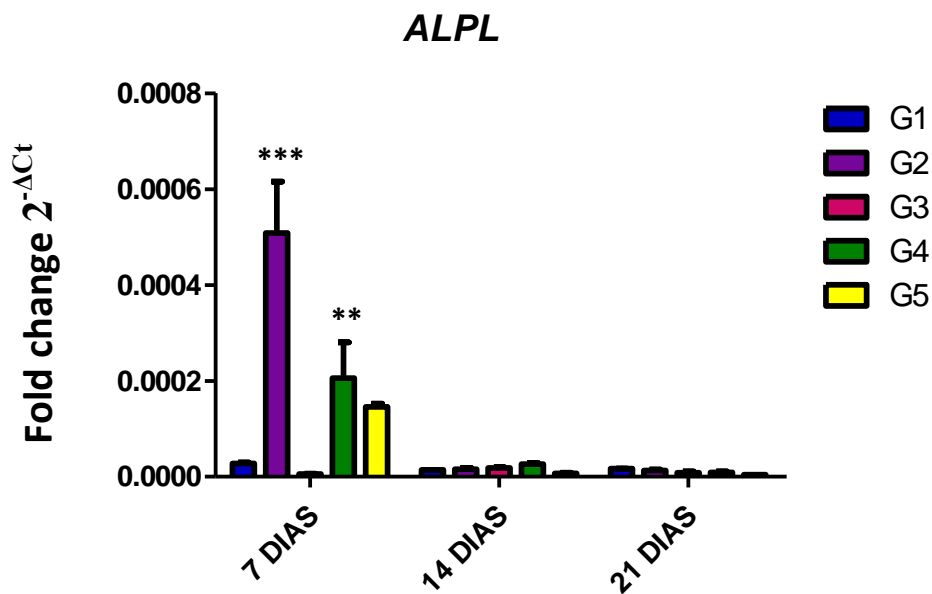
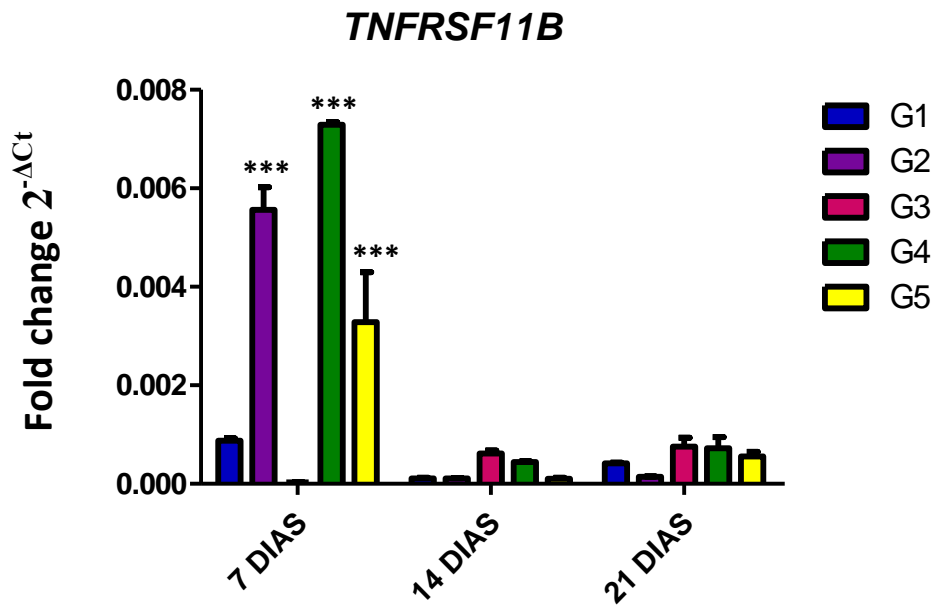


Figura 25 -Análise quantitativa de RT-qPCR dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 14 e 21 após cultivo celular dos genes *SPP1* (A), *ALPL* (B), *TNFRSF11B* (C), *RUNX2* (D), *BGLAP* (E), e *VEGF* (F). (Continuação)

C



D

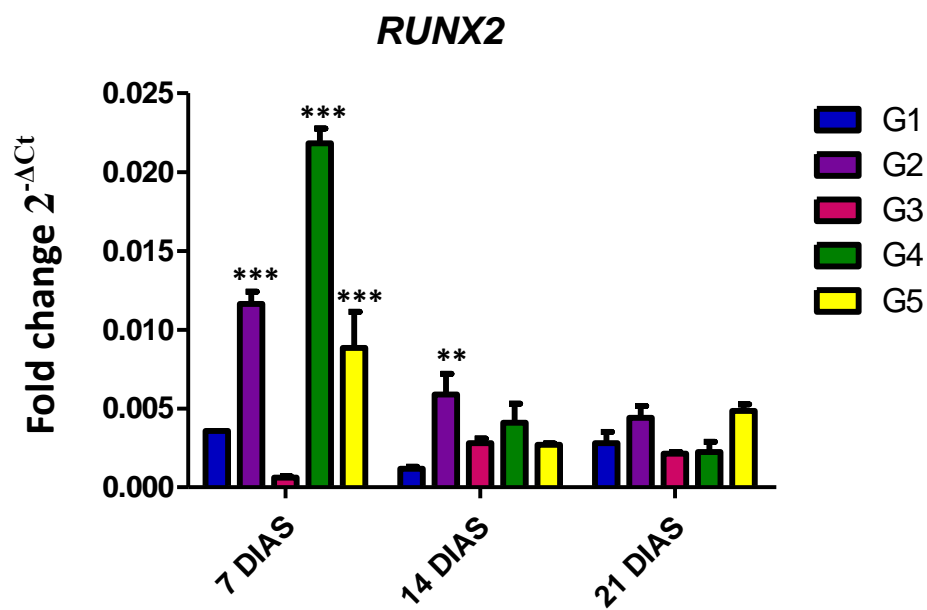
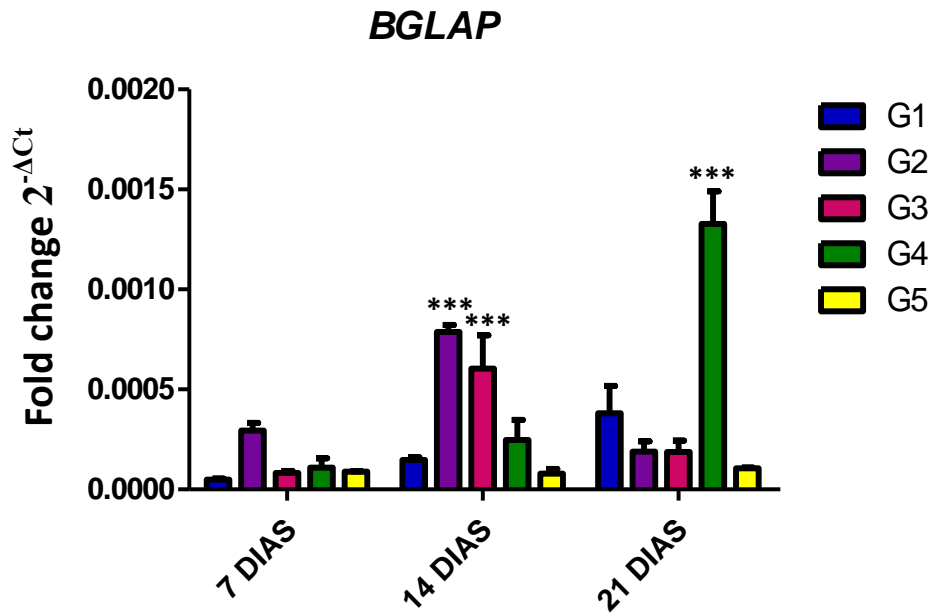
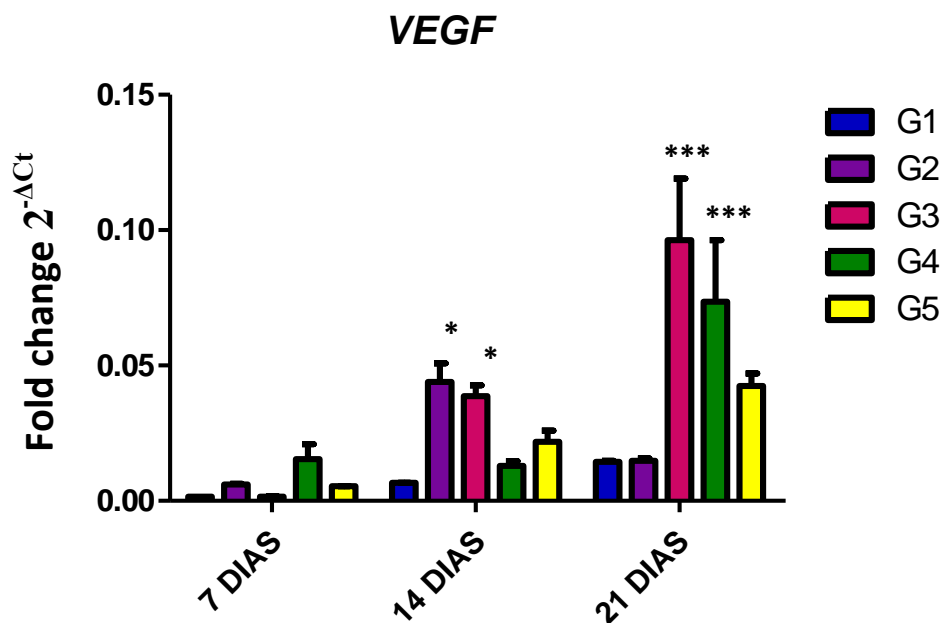


Figura 25 -Análise quantitativa de RT-qPCR dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 14 e 21 após cultivo celular dos genes *SPP1* (A), *ALPL* (B), *TNFRSF11B* (C), *RUNX2* (D), *BGLAP* (E), e *VEGF* (F). (Conclusão)

E



F



Barras indicam o nível médio de expressão gênica ( $2^{-\Delta Ct}$ ) +/- erro padrão. ANOVA two-way seguido do Teste de Bonferroni. \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\* =  $p < 0,1$ , \* =  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle de cada período.

Fonte: Elaborado pela autora

Em termos gerais, houve uma tendência significativa do aumento da expressão de genes candidatos durante os períodos analisados *in vitro* tratados com o grupo de interesse G4 (Células MC3T3-E1 + CB-HA-antiBMP-2 + 200 ng/ml de proteína), o que pode sugerir aceleração da diferenciação/atividade dos osteoblastos com o uso desse biomaterial.

Os genes *SPP1*, *BGLAP* e *VEGF* apresentaram aumento da expressão gênica proporcional ao período de contato do G4 com as células, sendo mais evidente e significativa a expressão no período de 21 dias comparado aos outros grupos (Figura 25: B, C, D)

Os genes *ALPL*, *RUNX2* e *TNFRSF11B* demonstraram aumento da expressão gênica para o grupo 4 no período de 7 dias, sendo esta diferença não sustentada nos próximos períodos (Figura 25: A, E, F)

Considerando o grupo de interesse (G4), o qual simularia uma situação do contato de CB-HA-antiBMP-2 num ambiente *in vivo* com a presença de BMP-2 endógena num processo de reparação óssea, os genes *ALPL*, *RUNX2* e *TNFRSF11B* apresentariam aumento da expressão gênica logo nos primeiros dias, enquanto os genes *SPP1*, *BGLAP* e *VEGF* teriam aumento da expressão com o passar do tempo de contato do biomaterial.

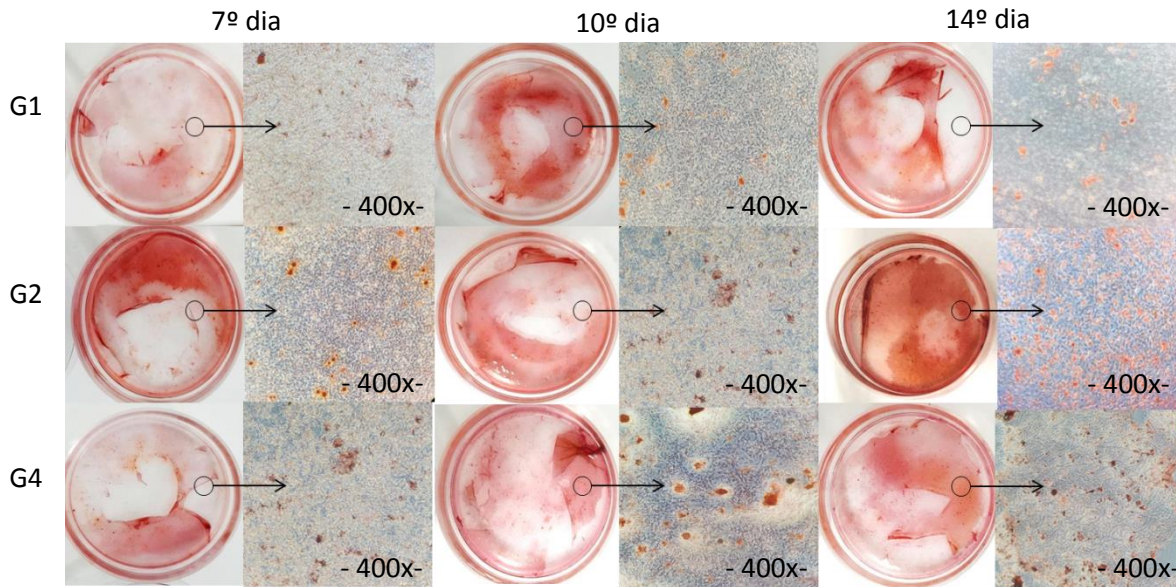
#### **4.6 Detecção da Formação de Nódulos Minerais por Coloração com Vermelho de Alizarina**

A análise dos nódulos minerais foi realizada sobre cada material objeto de investigação, após o cultivo celular das células MC3T3-E1 pelo período de 7, 10 e 14 dias. Na Tabela 10 estão apresentados os grupos testados.

Os grupos: G2, G4 e G5 tiveram a troca da proteína BMP-2 (200 ng/ml) duas vezes por semana, juntamente com o meio de cultura osteogênico.

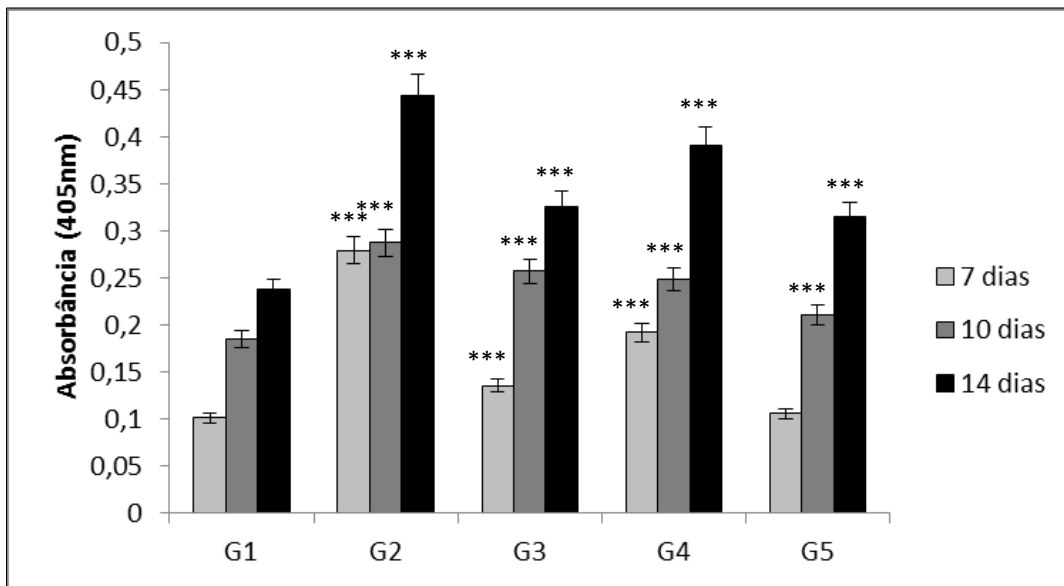
Os materiais controles (G1 e G2) e o material de interesse (G4) foram avaliados macroscopicamente e microscopicamente (Figura 26), além de ser realizada a análise quantitativa da mineralização em todos os grupos (Figura 27).

Figura 26 -Análise macroscópica e microscópica dos nódulos minerais por Vermelho de Alizarina dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 10 e 14 dias após cultivo celular.



Fonte: Elaborada pela autora

Figura 27 -Análise quantitativa dos nódulos minerais por Vermelho de Alizarina dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 10 e 14 dias, por leitura de absorbância a 405 nm.



Barras indicam o maior potencial osteogênico de culturas de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com o resultado acima, é possível concluir que houve uma tendência significativa do aumento da formação de nódulos minerais em todos os grupos em relação ao G1, isso indica que a presença por si só de algum fator externo como CB-HA, a proteína BMP-2 e o anticorpo anti-BMP-2 isolados ou combinados são capazes de acentuar o potencial osteogênico.

Os grupos tratados com a proteína BMP-2 (G2, G4 e G5), ao final de 14 dias, foram os que demonstraram um índice maior de formação dos nódulos. Sabendo que o G2 representa o controle positivo, o grupos G4 (Células MC3T3-E1 + CB-HA-antiBMP-2 + 200 ng/ml de proteína), que é o grupo de interesse e um tratamento alternativo para a condição de G2, obteve um resultado satisfatório demonstrando apresentar um potencial promissor para ser utilizado como biomaterial para reparação óssea.

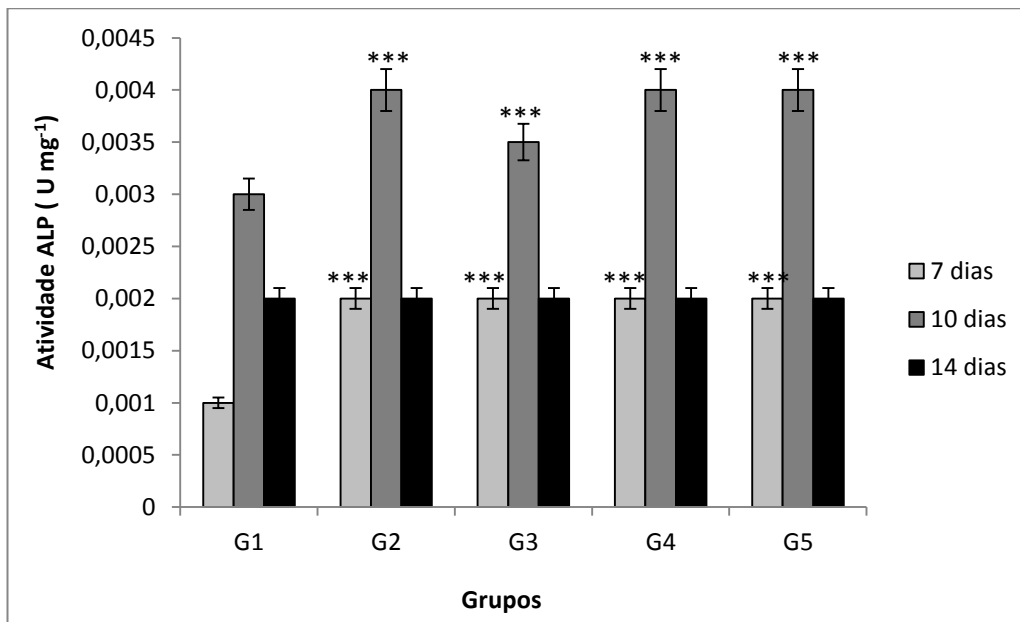
#### 4.7 Atividade da Proteína Fosfatase Alcalina (ALP)

A atividade da proteína ALP foi verificada novamente sobre cada material objeto de investigação representado na Tabela 10, após o cultivo celular das células MC3T3-E1 pelo período de 7, 10 e 14 dias.

Os grupos: G2, G4 e G5 tiveram a troca da proteína BMP-2 (200 ng/ml) duas vezes por semana, juntamente com o meio de cultura osteogênico.

Para se obter o resultado da atividade de ALP (Figura 28), é realizado a razão entre a concentração de ALP sobre a quantidade de proteínas totais.

Figura 28 -Análise quantitativa da atividade de ALP dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 nos períodos de 7, 10 e 14 dias após cultivo celular em 595 nm.



Barras indicam a atividade de ALP de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora

O resultado acima demonstra que em relação aos períodos de 7 e 10 dias houve uma diferença significativa de todos os grupos em relação ao grupo controle G1. Novamente, pode-se concluir que a atividade de ALP também pode ser influenciada por um fator externo.

Todos os grupos tiveram um aumento da atividade de ALP em até 10 dias, o que indica que a atividade dessa proteína ocorre entre 8-12 dias, sofrendo em seguida um declínio.

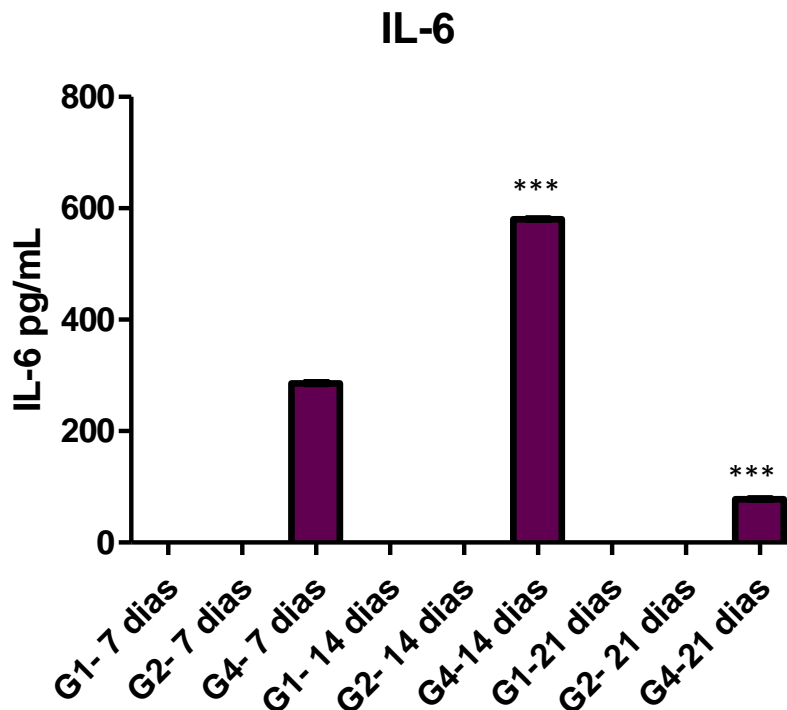
Esse dados concordam com o resultado apresentado na expressão gênica de ALP, indicando o aumento da expressão do gene próximo ao período de 7 dias e após observado seu declínio. É possível confirmar também pelo ensaio de expressão gênica que os grupos G2, G4 e G5 apresentaram relativamente um aumento da expressão do gene ALP em torno de 10 dias, o que pode ser justificado pela utilização da proteína BMP-2 nesses grupos.

#### 4.8 Quantificação da Produção de IL-6 e TGF- $\beta$ por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A produção de IL-6 e TGF- $\beta$  foram quantificadas através dos sobrenadantes dos grupos G1, G2 e G4 da Tabela 10, após o cultivo celular das células MC3T3-E1 durante o período de 7, 14 e 21 dias.

Os grupos G2 e G4 tiveram a troca da proteína BMP-2 (200 ng/ml) duas vezes por semana, juntamente com o meio de cultura osteogênico. O ensaio ELISA foi realizado para quantificar a produção de IL-6 (Figura 29) e TGF- $\beta$  (Figura 30).

Figura 29 -Análise quantitativa da produção de IL-6 dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

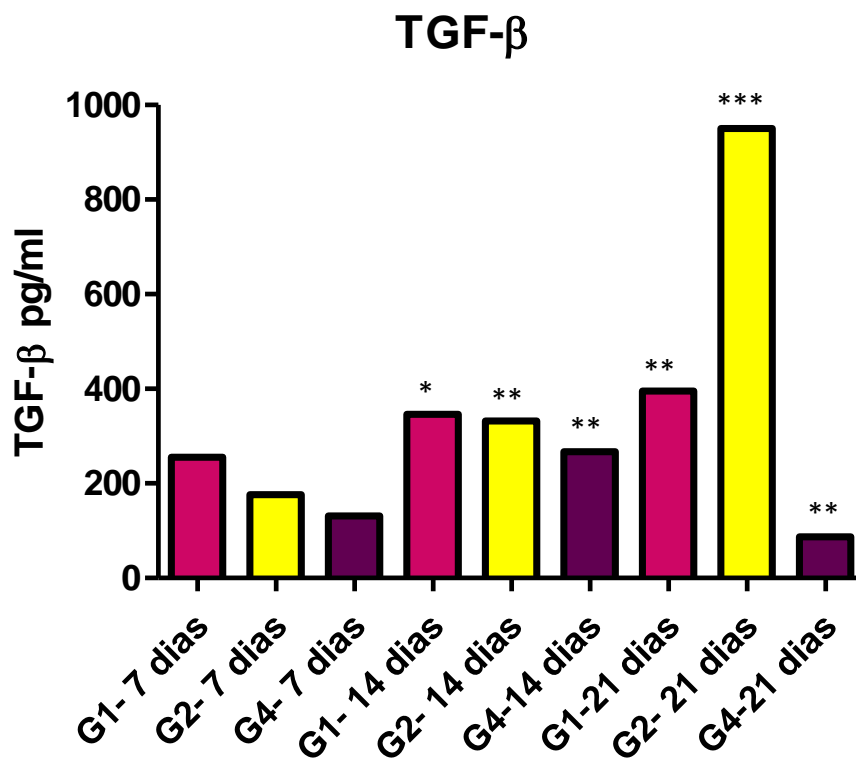


Barras indicam a quantidade detectada de IL-6 de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora

Os níveis expressos de IL-6 não foram identificados em G1 e G2. De acordo com o resultado acima, é possível verificar uma tendência significativa do aumento da expressão de IL-6 pela presença de G4 nas células osteoblásticas com 14 dias, com diminuição da expressão aos 21 dias.

Figura 30 -Análise quantitativa da produção de TGF- $\beta$  dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 14 e 21 dias.



Barras indicam a quantidade detectada de TGF- $\beta$  de acordo com o material investigado +/- erro padrão. ANOVA one-way seguido do Teste de Tukey. \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com o resultado acima, pode-se observar uma tendência significativa do aumento da expressão de TGF- $\beta$  com o passar do tempo para todos os grupos, estando diminuída somente para o G4 com 21 dias.

## 5 DISCUSSÃO

As características físico-químicas das membranas desenvolvidas à base de CB-HA e FS-HA foram averiguadas. A análise por FTIR dos grupos funcionais relacionados às fases de apatita precipitada nas membranas revelou que a hidroxiapatita foi incorporada de maneira eficiente à membrana de CB-HA. As principais atribuições que caracterizam a celulose se mantiveram e foi sugerido uma possível interação dos cristais de HA com os grupos hidroxilas da celulose pelo decréscimo na intensidade da banda 3500-3200  $\text{cm}^{-1}$ . No espectro CB-HA, pode-se observar que a diminuição da intensidade desta banda pode estar diretamente relacionada às ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas e as fases de apatita. A ligação química entre HA e a CB estabilizou o compósito, podendo manter uma integridade mecânica necessária para substituição óssea<sup>55,56</sup>.

A análise de FTIR para as membranas de FS-HA revelou que as bandas características da fibroína entre 1700-1000  $\text{cm}^{-1}$  não estavam presentes como observadas no espectro da FS. O recobrimento da membrana pela hidroxiapatita pode ser a causa pelo qual o aparelho FTIR não tenha conseguido detectar a proteína fibroína.

A morfologia e a estrutura dos respectivos compósitos, bem como a análise dos cristais de apatita incorporados aos mesmos foram avaliados por MEV/EDS. A micrografia para a membrana de CB-HA revelou a presença de cristais de HA de ordem nanométrica recobrando as fibras de CB. Apesar da CB apresentar poros relativamente pequenos de ordem nanométrica, eles permitem que os íons entrem livremente dentro da matriz, favorecendo a formação de cristais de HA no interior de sua estrutura tridimensional<sup>56</sup>. A estrutura molecular da celulose bacteriana pode ter contribuído para a deposição homogênea dos cristais de apatita, uma vez que estudos prévios têm constatado que grupos funcionais, tais como hidroxilas, fosfatos e carboxílicos propiciam a nucleação de fases de apatitas<sup>63,70,71</sup>. Os grupos hidroxilas da celulose têm dipolo negativo forte, os quais promovem a ligação dos cátions  $\text{Ca}^{2+}$  livres da solução de  $\text{CaCl}_2$  e formam ligações coordenadas e, assim, os íons  $\text{PO}_4^{3-}$  ligam-se ao cálcio associado à CB formando o núcleo inicial para formar as fases precursoras de apatita<sup>29,71,72</sup>.

A membrana de FS-HA revelou a presença de cristais HA de ordem nanométrica recobrando a superfície da FS de forma homogênea e de algumas regiões com deposição aumentada dos cristais.

Chunling et al.<sup>73</sup> investigaram a estrutura e propriedades de filmes de FS associada à hidroxiapatita e analisaram por MEV filmes que possuíam diferentes proporções de hidroxiapatita. Foi verificado que os filmes que possuíam maior quantidade de hidroxiapatita

apresentaram um granulado protuberante de componentes inorgânicos. Os resultados sugeriram que a adição excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  impediram a distribuição uniforme da fase inorgânica e o teor teórico de HA (porcentagem em peso) em 21% era presumivelmente o ponto crítico para fabricar os filmes homogêneos. Logo, pode-se inferir, baseando-se no trabalho de Chunling et al.<sup>73</sup>, que as regiões do presente estudo que apresentaram cristais exuberantes de HA podem ter ocorrido pela adição excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  e pela distribuição uniforme da fase inorgânica.

A análise de EDS revelou que as razões molares Ca/P foram mensuradas e para as membranas CB-HA foi obtida uma média de razão molar Ca/P de 1,52 referente à hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) e, para a membrana FS-HA, foi obtida uma média de razão molar Ca/P de 1,30 referente a um fosfato-octacálcio (OCP)<sup>74</sup>. Esta diminuição na razão molar Ca/P pode ser devido ao início da dissolução dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , à substituição dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$  ou ainda à substituição de íons  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$ <sup>56</sup>.

As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas quanto à resistência à tração, alongamento e módulo de elasticidade. Todas as amostras que continham hidroxiapatita demonstraram ser menos resistentes mecanicamente (menores valores de Rp) e diferentes significativamente em relação às membranas sem hidroxiapatita. A presença de hidroxiapatita deve ser responsável pela formação de uma estrutura altamente compactada, com pequenos espaços intermoleculares que não permitiram um suficiente rearranjo estrutural traduzido pela deformação plástica, atingindo mais rapidamente o ponto de cedência e caracterizando uma estrutura mais frágil<sup>68</sup>.

As membranas obtidas sem a incorporação da hidroxiapatita ao contrário, apresentaram-se mais resistentes mecanicamente, provavelmente devido à formação de uma estrutura menos compactada, com amplos espaços intermoleculares que devem permitir um extenso rearranjo estrutural em razão da aplicação de uma tensão antes que o ponto de cedência seja atingido<sup>68</sup>. Os resultados de Ep estão de acordo com os de Rp para as membranas de celulose bacteriana, uma vez que as membranas que exibiram maior gasto de energia na perfuração foram as mesmas que mostraram maior Rp. Os parâmetros avaliados aumentaram nas amostras umedecidas, revelando que as membranas tornaram-se menos frágeis. Esses resultados podem ser interessantes, pois podem conferir uma maior resistência das membranas utilizadas in vivo.

Contudo, as biocerâmicas apresentam uma limitação em aplicação clínica, devido à baixa resistência mecânica quando comparado a outros biomateriais metálicos e poliméricos, não permitindo que sejam usadas como forma de ancoragem para implantes, mas sim para o

recobrimento em materiais de alta resistência mecânica<sup>56</sup>, ou como materiais de preenchimento ósseo.

Sepúlveda et al.<sup>75</sup> mostraram que o cimento de hidroxiapatita facilita o contorno ósseo além de ser clinicamente usado como uma biocerâmica reparadora de osso pela sua similaridade com a composição do osso mineral e pela capacidade de sua osteocondução, sendo um importante biomaterial para a substituição óssea em ortopedia, cirurgia reconstrutiva crânio-facial, implante dentoalveolar e cirurgias orais<sup>56</sup>.

As propriedades hidrofílicas dos compósitos foram avaliadas antes e após a imobilização dos anticorpos anti-BMP-2 nas membranas pelo teste do ângulo de contato. Todos os materiais demonstraram ser hidrofílicos por possuírem ângulo de contato  $\theta < 90^\circ$ , porém a presença dos anticorpos nas amostras foi capaz de reduzir ainda mais este ângulo e deixar as membranas mais hidrofílicas, o que é benéfica para a adesão e proliferação celular. Esses resultados podem ocorrer porque os grupos polares dos anticorpos proporcionam uma maior energia superficial, diminuindo assim o ângulo de contato da água da superfície<sup>76</sup>.

Em concordância com nossos resultados, Vellayappan et al.<sup>76</sup> realizou a caracterização do polímero uretano poliéster de silsesquioxano/poli (carbonato-ureia) impregnado com nanosilver (POSS-PCU-NS) com anticorpos anti-CD34 unidos covalentemente para melhorar a captura de células progenitoras endoteliais (EPC) circulante com finalidade antitrombogênica foi realizada e verificada o ângulo de contato. O polímero POSS-PCU exibiu certo grau de hidrofobicidade devido a um maior ângulo de contato verificado. Os resultados do ângulo de contato da água mostraram que a superfície do POSS-PCU tornou-se mais hidrofílico após a associação do anticorpo na superfície da amostra.

Chong et al.<sup>77</sup> investigaram a captura de células progenitoras endoteliais por anticorpos (CD34) conjugados na superfície de filmes de policaprolactona (PCL) para aplicações de implantes cardiovasculares a fim de promover a endotelização. Medidas de ângulo de contato demonstram que a superfície do filme de PCL é altamente hidrofóbica ( $73,5^\circ \pm 3,7^\circ$ ) e a conjugação subsequente de anticorpos CD34 reduziu estatisticamente significativa a hidrofobicidade ( $65,2^\circ \pm 2,7$ ), concordando novamente com os resultados do presente estudo.

A utilização de polímeros naturais para a confecção de biomateriais tem avançado nos últimos anos devido às características físico-químicas benéficas que eles oferecem. Entretanto, de acordo com Singh et al.<sup>41</sup> danos indiretos ao DNA como a promoção de estresse oxidativo e a resposta inflamatória também podem ocorrer devido à possibilidade de interação de partículas livres no citoplasma com o DNA durante o processo de divisão celular,

sendo necessária a realização de testes para garantir o potencial não tóxico e o uso seguro de biomateriais.

As membranas de CB, CB-HA, FS e FS-HA foram avaliadas *in vitro* para assegurar o potencial não tóxico. Para a linhagem CHO-K1, uma linhagem recomendada pela OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade de drogas e materiais, foi verificada que apenas a membrana FS demonstrou ser citotóxica, genotóxica e mutagênica.

Wang et al.<sup>78</sup> desenvolveram um scaffold tubular biomimético à base de FS associado à polietilenoglicol com finalidade de regeneração vascular. A citotoxicidade foi avaliada por meio do teste de MTT em células L929 (células endotéliais de veias umbilical humana) por 1, 3, 5 e 7 dias. Os resultados demonstraram que a replicação celular, a morfologia, viabilidade e proliferação celular foram satisfatórios. Em nossos estudos, a membrana de FS associada com a hidroxiapatita (FS-HA) também apresentou resultados satisfatórios em relação a não ser citotóxico, logo surgiu-nos a hipótese que quando há materiais associados à FS, esse polímero perde o seu potencial tóxico.

Barud et al.<sup>10</sup> desenvolveram scaffold esponjoso à base de CB-FS para a engenharia tecidual e área biomédica. A citotoxicidade foi avaliada por meio dos testes de XTT e MTT e a mutagenicidade por meio do teste do micronúcleo. Para os testes de citotoxicidade, a linhagem L929 foi utilizada e, para o teste de mutagenicidade, foi utilizada a linhagem V79. Para todos os testes os resultados foram promissores, não demonstrando nenhum potencial tóxico em relação à citotoxicidade e mutagenicidade. Portanto, tais resultados parecem reforçar a hipótese que quando a FS apresenta-se associada a outro polímero, esta torna-se promissora para a engenharia tecidual e como um biomaterial.

Entretanto, Moraes et al.<sup>79</sup> investigaram o potencial tóxico de membranas de FS após diferentes métodos de esterilização e verificaram o caráter não citotóxico pelo ensaio de MTS. Dessa forma, supõe-se que a citotoxicidade de membranas de FS podem estar relacionadas à estrutura terciária da proteína fibroína, uma vez que a solução de FS, investigada nos estudos preliminares do presente estudo também não foi citotóxica.

Rajkhowa et al.<sup>80</sup> evidenciaram que os cristais de seda são formados pelo empilhamento de folhas  $\beta$ , que por sua vez são formados por segmentos hidrofóbicos de cadeias pesadas de FS. As ligações de hidrogênio são responsáveis pelas forças intermoleculares nas folhas  $\beta$ . As fracas interações de Van der Waals proporcionam as forças intermoleculares de empilhamento entre as folhas  $\beta$ . A energia mecânica é capaz de romper as forças de Van der Waals, perturbando a ordem de empilhamento regular das folhas  $\beta$ . A mudança na estrutura da

proteína fibroína é refletida na posição e intensidade do pico analisado por FTIR. Os autores afirmam também que, de acordo com alguns estudos preliminares, materiais de FS contendo folhas  $\beta$  não mostraram citotoxicidade.

Numata et al.<sup>81</sup> estudando os mecanismos de degradação enzimática de cristais de folha  $\beta$ , evidenciaram que a degradação natural de cristais de FS em amostras em que a proteína encontra-se em folhas  $\beta$  não demonstraram citotoxicidade em célula de feocromocitoma de ratos (PC12) pelo ensaio de MTS. Por outro lado, a degradação em estruturas  $\alpha$ -hélice ocorreu mais lentamente e os produtos de degradação não natural da protease XIV mostraram maior citotoxicidade devido à geração mais rápida de fragmentos com maior peso molecular.

De acordo com o estudo de Numata et al.<sup>81</sup> e Rajkhowa et al.<sup>80</sup>, supõe-se que a solução de FS, a qual não foi feita análise por FTIR, apresente a proteína fibroína na estrutura terciária em folhas  $\beta$ , uma vez que a mesma não foi citotóxica. Já a membrana de FS, pode ter sofrido a ação de alguma energia mecânica durante o seu processamento, a qual provocou uma mudança na estrutura da proteína, confirmado pela análise do FTIR, que evidenciou a conformação da estrutura em  $\alpha$ -hélice.

Levando em consideração a citotoxicidade das membranas de FS, os próximos ensaios poderiam ser realizados apenas com as membranas FS-HA, entretanto, a caracterização físico-química das mesmas não foram satisfatórias. Pela análise de FTIR, foi possível verificar que houve uma modificação no espectro da proteína fibroína. No espectro de FS, a absorção do amido carbonilo em  $1634\text{cm}^{-1}$  foi atribuída à estrutura  $\alpha$ -hélice, enquanto no espectro de FS-HA essa banda diminuiu, sugerindo que a proteína fibroína foi recoberta intensamente pelo cristais de HA que o aparelho FTIR não foi capaz de identificar os grupos funcionais presentes. Outro fator observado foi no espectro de EDS, em que os compósitos FS-HA (Figura 14 B) obtiveram uma razão molar Ca/P entre 1,28-1,32 com uma média de 1,30, referindo-se a uma razão molar Ca/P de carbonato-apatita<sup>74</sup> e não de CDHA, cuja razão molar Ca/P é de 1,50, como obtido para as membranas de CB-HA.

Por esses motivos, preferiu-se dar continuidade aos testes apenas com as membranas à base de CB, realizando os ensaios nas membranas CB-HA, uma vez que o objetivo do trabalho foi a incorporação da hidroxiapatita e essa, apesar de estar na fase de apatita deficiente em cálcio, foi a que mais se aproximou da hidroxiapatita, cuja razão molar Ca/P é de 1,67.

Os mesmo testes foram repetidos na linhagem celular MC3T3-E1, uma linhagem pré-osteoblástica, apenas com as membranas CB-HA. A citotoxicidade, avaliada pelo ensaio

XTT, foi avaliada por 7, 14 e 21 dias. Todos os dias avaliados demonstraram viabilidade celular acima de 80%, indicando o caráter não citotóxico das membranas.

O resultado referente ao 7º dia demonstra um leve decréscimo da viabilidade celular se comparado aos outros dias (14 e 21 dias) e também se comparado ao resultado do ensaio XTT realizado com as células CHO-K1, que estiverem em contato com a membrana CB-HA apenas por um dia. Kim et al.<sup>82</sup> associaram esse fato às proteínas extracelulares de adesão, responsáveis em aderir as células no biomaterial e permitir sua proliferação. Supõe-se que as células CHO-K1, que estiverem em contato por apenas um dia com a membrana, não tiveram tempo o suficiente em se aderir à membrana, porém, é possível verificar que o mesmo não foi citotóxico para aquelas já aderidas na placa. Em relação ao ensaio nas células MC3T3-E1, a princípio, pode ter ocorrido uma perturbação no sistema durante a fase de adesão das células à membrana, mas que a mesma foi solucionada, como pode ser visto nos próximos 14º e 21º dias. Dessa forma, foi constatado e confirmado o caráter não citotóxico da CB-HA e também o genotóxico e mutagênico da membrana pelos outros testes.

He et al.<sup>83</sup> e Tazi et al.<sup>84</sup> constataram o caráter não tóxico e a biocompatibilidade da CB associada à hidroxiapatita em um filme orgânico-inorgânico em células 293T; e em scaffolds em linhagens osteoblásticas Saos-2, respectivamente, por meio do ensaio MTT. De acordo com esses resultados e os do presente estudo, é possível concluir que a materiais à base de CB associada à HA independentes do formato e da linhagem avaliada não foram citotóxicos e demonstraram caracterizar-se como uma excelente matriz para a incorporação dos anticorpos anti-BMP-2.

Massari et al.<sup>85</sup> estudaram a resposta tecidual in vivo após a implantação subcutânea de membranas de CB e hidroxiapatita (Hap) em ratos machos. Foi avaliada a quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares, bem como a presença de cápsula fibrosa. Não houve diferença quanto ao padrão inflamatório de materiais CB e CB-Hap quando comparado ao padrão de politetrafluoroetileno, estando de acordo com os resultados in vitro do presente estudo.

Scarel-Caminaga et al.<sup>86</sup> desenvolveram membranas de CB funcionalizadas com HA ou colágeno com adição ou não de peptídeos de crescimento osteogênico (OGP) como biomaterial promissor para reparação óssea. A toxicidade dos materiais foi avaliada através dos mesmos testes e linhagem que o presente estudo (CHO-K1). Os materiais CB e CB-HA não apresentaram diferença estatística para os ensaios de XTT e SC comparados ao controle negativo. A genotoxicidade e mutagenicidade também não foram evidenciadas em relação aos parâmetros de índice de danos no DNA (ensaio cometa) e a frequência de micronúcleos (teste

do micronúcleo), respectivamente. Esses resultados vêm de encontro aos demonstrados no presente estudo, o qual demonstrou ausência de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das membranas de CB-HA.

Freire et al.<sup>35</sup>, para determinarem a concentração de saturação de anticorpos anti-BMP-2 em um scaffold de colágeno absorvível (ACS), quantificaram a ligação de anticorpos *in vitro*, ligados com anticorpos secundários associados a fluoróforos e analisados por microscopia confocal de varredura a laser por 7 dias. A concentração de (25 µg/ml) foi estabelecida como a concentração de saturação, sendo este o protocolo utilizado no presente estudo.

A adsorção dos anticorpos nas membranas foi confirmada pelo estudo *in vitro* com a utilização de um anticorpo secundário anti-humano de camundongo conjugado com FITC. Houve uma redução da adsorção dos anticorpos em aproximadamente 70% em 7 dias e de 90% em 14 dias. Ansari et al.<sup>62</sup> verificaram a ligação e a cinética de liberação de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 associado a um complexo com a proteína G em ACS por até 14 dias. Os resultados obtidos através de anticorpos secundários associados com FITC confirmaram a ligação dos anticorpos nos ACS e que a presença da proteína G utilizada para aumentar a fixação de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 nos scaffolds não inibiu a liberação dos anticorpos. Além disso, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos níveis de anticorpos detectados no scaffold de ACS + proteína G e apenas nos scaffolds de ACS durante o período avaliado (1,7 e 14 dias).

Moshaverinia et al.<sup>87</sup> estudaram a ligação e a liberação *in vitro* de anticorpos monoclonais anti-BMP-2 (25 µg/ml) em microesferas de alginato. Da mesma forma que o presente estudo, o perfil de liberação dos anticorpos das microesferas de alginato foi avaliado utilizando microscopia de fluorescência com anticorpo secundário associado ao fluoróforo (FITC) e também mostrou sustentação de anticorpos por até 14 dias.

A análise de expressão gênica revelou um aumento da expressão dos genes candidatos *SPPI1*, *BGLAP*, *VEGF*, *ALPL*, *RUNX2* e *TNFRSF11B* no grupo de interesse G4 (células MC3T3-E1 + CB-HA-antiBMP-2 + 200 ng/ml de proteína), sendo alguns mais precocemente e outros mais tardiamente em relação ao período analisado. Na figura 20B, o nível de expressão do G2 foi maior que o G4, demonstrando que a proteína BMP-2 por si só é capaz de promover a expressão de genes no processo de reparo, o que de fato é correto. O principal papel das BMPs é o recrutamento de células mesenquimais para o local de cicatrização e, em seguida, diferenciá-las em linhagem osteogênica, resultando em nova formação óssea, além de que a BMP-2 desempenha um papel importante na expressão de marcadores osteogênicos

como a fosfatase alcalina (ALP)<sup>2</sup>. No entanto, é sabido que para o resultado esperado, é necessário doses supra-fisiológicas, o que acarreta em um alto custo, além da incapacidade de manter a concentração do fator de crescimento por longos períodos de tempo e a menor atividade biológica de rhBMPs em relação ao BMP endógeno<sup>35</sup>.

Pigossi et al.<sup>88</sup> investigaram o potencial de reparação óssea de um compósito de CB-HA associado ou não ao peptídeo *osteogene growth peptide* (OGP) em camundongo, através da expressão dos genes *ALPL*, *RUNX2*, *TNFRSF11B*, *SPP1*, *BGLAP* e *VEGF*. Da mesma maneira que os resultados do presente estudo, os genes *RUNX2* e *TNFRSF11B* apresentaram aumentos significativos em períodos iniciais da regeneração óssea na presença de CB-HA-OGP. Os demais genes foram expressos nos períodos mais tardios da regeneração óssea, com diferenças estatísticas em comparação ao grupo controle.

He et al.<sup>89</sup> desenvolveram um scaffold à base de quitosana, alginato e hidroxiapatita (QAH) como um transportador de BMP-2 e avaliariam a expressão gênica in vitro em células mesenquimais. Os genes osteopontina e osteocalcina foram avaliados em relação ao scaffold QAH com BMP-2 e QAH sem BMP-2, e os resultados demonstram que a presença da proteína BMP-2 aumentou significativamente a expressão dos genes avaliados, da mesma maneira que os resultados do presente estudo. Os autores concluíram, juntamente com outros ensaios in vitro e in vivo, que a combinação de QAH/BMP-2 melhora a formação óssea e promove um reparo quase completo em defeitos de calvária de camundongos.

Guex et al.<sup>90</sup> investigaram a expressão gênica dos genes *ALPL*, *RUNX2* e colágeno em um scaffold à base de poli (3,4-etilenodioxetiofeno) poliestireno sulfonato (PEDOT:PSS) por 28 dias em células MC3T3-E1. Semelhante aos resultados do presente estudo, demonstraram que todos os genes tiveram um aumento da expressão quando comparado à quantidade expressa no primeiro dia, revelando a importância dos mesmos no processo de reparo ósseo, através da diferenciação de células precursoras osteogênicas (MC3T3-E1) e pelo depósito de mineralização.

Calasans-Maia et al.<sup>91</sup> estudaram microesferas de hidroxiapatita carbonatada nanoestruturada/alginato de cálcio (HCA) usadas para reparo ósseo alveolar. Os autores investigaram os níveis de RANK/OPG uma vez que é descrito como um mediador dominante de osteoclastogênese, e verificaram que houve aumento da reabsorção óssea e uma liberação inicial de moléculas envolvidas na ativação do osso. O presente estudo também demonstrou um aumento de OPG nos períodos iniciais, indicando ação promissora do biomaterial para reparo ósseo.

Zaborowska et al.<sup>92</sup> demonstraram, através de testes semelhantes ao presente estudo, utilizando o ensaio de formação de nódulos minerais com vermelho de alizarina, que scaffolds de celulose bacteriana nanoporosa (CB-n) facilitam o crescimento de osteoblastos e a formação de um tecido mineralizado após 7 e 14 dias em células MC3T3-E1. Esses resultados estão de acordo com o presente estudo, onde apenas a presença da membrana de CB-HA foi capaz de induzir a formação de nódulos minerais se comparada ao grupo controle (G1).

Luppen et al.<sup>93</sup> estudaram o papel de BMP-2 (10 e 100 ng/ml) na restauração da mineralização óssea, após o tratamento com glicocorticoides (GC), os quais inibem a ação dos osteoblastos e induzem a osteoporose. Ensaios de fosfatase alcalina (ALP) e vermelho de alizarina foram realizados em células MC3T3-E1. Semelhante ao presente estudo, a atividade de ALP foi detectada atingindo um nível máximo em 10 dias, demonstrando o papel dessa proteína, nas duas concentrações, na restauração óssea. A formação de nódulos de mineralização impedida pelo GC, também foi restaurada quando tratado com BMP-2 nas duas concentrações.

É possível identificar que a presença da proteína BMP-2 no presente estudo induziu uma formação maior de nódulos minerais em G2 e G4 e aumentou a atividade de ALP nos grupos G2, G4 e G5, demonstrando mais uma vez o papel essencial da proteína no recrutamento de células mesenquimais para o local de cicatrização e, posterior diferenciação em linhagem osteogênica, resultando em nova formação óssea.

Os estudos de Zimmermann et al.<sup>94</sup> também estão de acordo com este presente estudo, uma vez que demonstraram que a presença de nanocompósitos de CB e HA aumentaram significativamente a atividade de ALP, após 12 dias em células MC3T3-E1, tornando-se um excelente material para reparação óssea.

A presença de IL-6 é capaz de estimular a reabsorção óssea e induzir a formação osteoclastos<sup>95</sup>. Além disso, é reconhecido que IL-6 influencia a formação óssea como fator osteotrópico sob a condição de aumentar o turnover ósseo<sup>96</sup>. A expressão de IL-6 promove a angiogênese, a produção de fatores de crescimento como *VEGF* e a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, o que é fundamental para a regeneração óssea normal. Além disso, a ausência de IL-6 atrasa a mineralização e remodelação do calo da fratura, sendo essencial para os estágios iniciais da cicatrização de fraturas<sup>97</sup>. No presente estudo, é possível verificar que houve um aumento da expressão de IL-6 no grupo de interesse (G4), indicando que o material proposto é capaz de induzir fatores relacionados ao processo de reparação óssea.

A expressão de TNF promove osteoclastogênese direta e indireta através da estimulação de expressão de *RANKL* e de uma diminuição de osteoprotegerina em osteoblastos e fibroblastos<sup>97</sup>. TGF- $\beta$  é expresso em níveis elevados em osteoblastos maduros nas superfícies ósseas durante o desenvolvimento e crescimento ósseo e também na cicatrização de fraturas ósseas<sup>98</sup>. Essa informação está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que é possível identificar um aumento gradativo entre 7, 14 e 21 dias da expressão de TGF- $\beta$  para os grupos G1 e G2, exceto para o G4, que houve um declínio com 21 dias. No entanto, isso demonstra a presença de osteoblastos em processo de crescimento ósseo.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão, de acordo com os resultados obtidos:

- Os materiais foram sintetizados conforme a metodologia proposta;
- Devido aos resultados obtidos na membrana FS-HA, em relação à toxicidade e ao ensaio EDS referente à razão molar Ca/P, deu-se continuidade aos testes somente com a membrana de CB-HA-antiBMP-2;
- A membrana CB-HA-antiBMP-2 apresentou características físico-químicas esperadas. Foi confirmada pelos ensaios de MEV-EDS e FTIR a presença dos componentes de CB e HA nas membranas, obteve resistência mecânica necessária para agir como materiais de preenchimento ósseo e é classificado como hidrofílico o que permite a adesão e proliferação celular.
- Não apresentou potencial tóxico na avaliação da toxicidade *in vitro* nas linhagens CHO-K1 e MC3T3-E1 pelos ensaios de citotoxicidade (Ensaio do XTT e Sobrevivência Clonogênica), genotoxicidade (Ensaio Cometa) e mutagenicidade (Teste do Micronúcleo);
- Obteve satisfatória adsorção de anticorpos, o que foi visualizado e comprovado através do conjugado de anticorpos com FITC por meio de microscopia de imunofluorescência,
- O biomaterial foi capaz de aumentar a expressão dos genes *SPPI*, *BGLAP* e *VEGF*, *ALPL*, *RUNX2* e *TNFRSF11B*, os quais estão envolvidos na reparação óssea através da realização de PCR em tempo real (RT-qPCR) em células MC3T3-E1;
- Os estudos de mineralização óssea e a atividade da fosfatase alcalina demonstraram que o material proposto e analisado sob as condições que mimetizavam um ambiente *in vivo* obteve resultados satisfatórios, uma vez que aumentou os nódulos de mineralização e os níveis de atividade da ALP, quando comparado ao grupo controle, podendo ser uma opção ao tratamento utilizado atualmente, que é a aplicação da proteína BMP-2.

Portanto, o processo de reparação óssea mediada por anticorpos monoclonais é uma alternativa que deve ser avaliada mais precisamente, realizando estudos *in vivo*, e tornando-se futuramente uma alternativa mais econômica se comparada à atual.

## REFERÊNCIAS\*

1. Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004; 25(15): 2941-8.
2. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Bioscienc*. 2004; 4(8): 743-65.
3. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Int J Mol Cell Med*. 2006; 10(1): 7-19.
4. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2004; 362(1825): 2821-50.
5. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *Arch Bone Jt Surg*. 1995; 77(6): 940-56.
6. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*. 2011; 9(1): 1.
7. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today*. 2008; 11(5): 18-25.
8. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012; 40(8): 706-18.
9. Santos MV. Bacterial cellulose and silk fibroin biopolymers: biotemplates to design nanostructured materials for optical applications [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química de Araraquara da Unesp; 2016.
10. Barud HO, Barud HDS, Cavicchioli M, do Amaral TS, de Oliveira Junior OB, Santos DM. et al. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. *Carbohydr Polym*. 2015; 128: 41-51.
11. Rockwood DN, Preda RC, Yücel T, Wang X, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc*. 2011; 6(10): 1612-31.
12. Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci*. 2007; 32(8): 991-1007.
13. Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. Bacterial synthesized cellulose—artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci*. 2001; 26(9): 1561-603.
14. Geyer U, Heinze T, Klemm D, Marsch S, Schumann D, Schmauder HP. Formation, derivatization and applications of bacterial cellulose. *Int J Biol Macromol*. 1994; 16: 343-7.
15. Barud HS, Gutierrez J, Lustrri WR, Peres MFS, Ribeiro SJL, Saska S, et al. Biomaterials from nature for advanced devices and therapies. Hoboken: John Wiley; 2016.
16. Cavicchioli M, Corso CT, Coelho F, Mendes L, Saska S, Soares CP. et al. Characterization and cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluations of bacterial cellulose membranes incorporated with ciprofloxacin: a potential material for use as therapeutic contact lens. *World J Pharm Pharm Sci*. 2015; 4: 1626-47.

---

\* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

17. Luangbudnark W, Viyoch J, Laupattarakasem W, Surakunprapha P, Laupattarakasem P. Properties and biocompatibility of chitosan and silk fibroin blend films for application in skin tissue engineering. *ScientificWorldJournal*. 2012; 12: 1-10.
18. Akkouch A, Zhang Z, Rouabhia M. A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. *J Biomater Res*. 2011; 96(4): 693–704.
19. Wang YW, Wu Q, Chen J, Chen GQ. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. *Biomaterials*. 2005; 26(8): 899-904.
20. Nordström EG, Sánchez Muñoz OL. Physics of bone bonding mechanism of different surface bioactive ceramic materials in vitro and in vivo. *Bio-medical Material Engineering*. 2001; 11(3): 221-31.
21. Ergun C, Liu H, Webster TJ. Osteoblast adhesion on novel machinable calcium phosphate/lanthanum phosphate composites for orthopedic applications. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89(3): 727-33.
22. Heo SJ, Kim SE, Wei J, Hyun YT, Yun HS, Kim DH. et al. Fabrication and characterization of novel nano-and micro-HA/PCL composite scaffolds using a modified rapid prototyping process. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89(1): 108-16.
23. Kang Y, Scully A, Young DA, Kim S, Tsao H, Sen M, Yang Y. Enhanced mechanical performance and biological evaluation of a PLGA coated  $\beta$ -TCP composite scaffold for load-bearing applications. *Eur Polym J*. 2011; 47(8): 1569-77.
24. Shasteen C, Kwon SM, Park KY, Jung SY, Lee SH, Park CG. et al. Biodegradable internal fixation plates enabled with X-ray visibility by a radiopaque layer of  $\beta$ -tricalcium phosphate and poly (lactic-co-glycolic acid). *J Biomater Res B*. 2013; 101(2): 320-9.
25. Huang J, Best SM, Bonfield W, Brooks RA, Rushton N, Jayasinghe SN, Edirisinghe, M.J. In vitro assessment of the biological response to nano-sized hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(4): 441-5.
26. Ming J, Zuo B. A novel electrospun silk fibroin/hydroxyapatite hybrid nanofibers. *Mater Chem Phys*. 2012; 137(1): 421-7.
27. Cao H, Chen X, Yao J, Shao Z. Fabrication of an alternative regenerated silk fibroin nanofiber and carbonated hydroxyapatite multilayered composite via layer-by-layer, *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(6): 599-608.
28. Andiappan M, Sundaramoorthy S, Panda N, Meiyazhaban G, Winfred SB, Venkataraman G, et al. Electrospun eri silk fibroin scaffold coated with hydroxyapatite for bone tissue engineering applications. *Prog Biomater*. 2013; 2(1): 1-11.
29. Hong L, Wang YL, Jia SR, Huang Y, Gao C, Wan YZ. Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. *Mater Lett*. 2006; 60(13): 1710-3.
30. Rath B, Namb J, Deschner J, Schaumburgera J, Tingard M, Grässela J. Biomechanical forces exert anabolic effects on osteoblasts by activation of SMAD 1/5/8 through type 1 BMP receptor. *Biorheology*. 2011; 8(1): 37–48.
31. Wozney JM., Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM., Whitters MJ, Kriz RW. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Obstet Gynecol Surv*. 1988; 44(5): 1-387.

32. Glowacki J. Demineralized bone and BMPs: Basic science and clinical utility. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 73(12): S126-31.
33. Epstein N. Complications due to the use of BMP/INFUSE in spine surgery: the evidence continues to mount. *Surg Neurol Int.* 2013; 4: 343.
34. Alt V, Heissel A. Economic considerations for the use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in open tibial fractures in Europe: the German model. *Curr Med Res Opin.* 2006; 22(1): S19-22.
35. Freire MO, You HK, Kook JK, Choi JH, Zadeh HH. Antibody-mediated osseous regeneration: A novel strategy for bioengineering bone by immobilized anti-bone morphogenetic protein-2 antibodies. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17(23-4): 2911-8.
36. Ansari S, Freire MO, Pang EK, Abdelhamid AI, Almohaimeed M, Zadeh HH. Immobilization of murine anti-BMP-2 monoclonal antibody on various biomaterials for bone tissue engineering. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1-10.
37. Naaman Bou-Abboud N, Patat JL, Guillemin G, Issahakian S, Forest N, Ouhatoun JP. Evaluation of the osteogenic potential of biomaterials implanted in the palatal connective tissue of miniature pigs using undecalcified sections. *Biomaterials.* 1994; 15: 2001-7.
38. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5): 2315-9.
39. Mendonça RH, Costa MF, Thiré RMSM. Produção de arcabouços tridimensionais bioativos para bioengenharia óssea. In: *Anais do 8º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais; 2015 agosto 19-22; Foz do Iguaçu, PR.* 2012;1: 1-14.
40. Gontijo AMMC, Tice R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas: mutagênese ambiental. Canoas: Ulbra; 2003.
41. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Biol.* 1988; 175(1):184-91.
42. Darroudi F, Natarajan AT. Cytological characterization of repair deficient CHO cell line 43-3B. I. Induction of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by UV and its modulations with 3-aminobenzamide. *Mutat Res.* 1985; 149(2): 239-47.
43. Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat Res.* 1997; 392(1): 31-43.
44. Poersch A. Atividade protetora da DCTN (trans-desidrocrotonina) na frequência de micronúcleos e apoptose induzidos por diferentes agentes mutagênicos in vitro. [dissertação de mestrado]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2005.
45. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000; 455: 81-95.
46. Ansari S, Moshaverinia A, Pi SH, Han A, Abdelhamid AI, Zadeh HH. Functionalization of scaffolds with chimeric anti-BMP-2 monoclonal antibodies for osseous regeneration. *Biomaterials.* 2013; 34(38): 10191-8.
47. Kim EC, Kim TH, Jung JH, Hong SO, Lee DW. Enhanced osteogenic differentiation of MC3T3-E1 on rhBMP-2-immobilized titanium via click reaction. *Carbohydr Polym.* 2014; 103: 170-8.

48. SSP1 secreted phosphoprotein 1 [Homo sapiens(human)]: gene ID: 6696. Update on 28 Mar 2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6696>
49. ALPL alkaline phosphatase , liver/bone/kidney [Mus musculus(house mouse)]: gene ID: 11647. Update on 27 Mar2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11647>
50. TNFRSF11B TNF receptor superfamily member 11b [Homo sapiens (human)]: gene ID: 4982. Updated on 28 Mar2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4982>
51. Runx2 runt related transcription factor 2 [Mus musculus(house mouse)]: gene ID: 12393. Updated on 13 Mar2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12393>
52. Bglap bone gamma carboxyglutamate protein [Mus musculus(house mouse)]: gene ID: 12096. Updated on 13 Mar2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12096>
53. Vegfa vascular endothelial growth factor A [Mus musculus(house mouse)]: gene ID: 22339. Updated on 27 Mar2018. [acesso em 22/02/2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22339>
54. International Organization for Standardization. ISO 10993-12: medical devices. Part 12: sample preparation. 4nd. ed. Geneva: ISO; 2012.
55. Hutchens SA, Benson RS, Evans BR, O'Neill HM, Rawn CJ. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*. 2006; 27(26): 4661-70.
56. Saska S, Barud HS, Gaspar AMM, Marchetto R, Ribeiro SJL, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater*. 2011; 2011: 175362.
57. Meneguim AB. Obtenção e caracterização de filmes de misturas de amido resistente e pectina como estratégia para liberação cólon específica de fármacos [dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp; 2012.
58. Thomazini AHA. Desenvolvimento de estruturas porosas de polietileno de ultra-alto peso molecular (PEUAPM) recobertas com apatitas para substituição e regeneração óssea [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química da Unesp; 2009.
59. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure change in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res*. 1990; 24(6): 721-34.
60. Moller P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 96(1):1-42.
61. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*. 1989; 13(1): 34-43.
62. Ansari S, Freire M, Choi MG, Tavari A, Almohaimed M, Moshaverinia A, Zadeh HH. Effects of the orientation of anti-BMP2 monoclonal antibody immobilized on scaffold in antibody-mediated osseous regeneration. *J Biomater Appl*. 2015; 30(5): 558-67.
63. Cromme P, Zollfrank Z, Müller L, Müller FA, Greil P. Biomimetic mineralisation of apatites on Ca<sup>2+</sup> activated cellulose templates. *Mater Sci Eng C*. 2007; 27(1): 1-7.

64. Wan YZ, Huang Y, Yuan CD, Raman R, Zhu Y, Jiang HJ, He F, Gao C. Biomimetic synthesis of hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposites for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Biomim Supramol Syst.* 2007; 27(4): 855-64.
65. Kim TI, Jang JH, Kim HW, Knowles JC; Ku Y. Biomimetic approach to dental implants. *Curr Pharm Des.* 2007; 14(22): 2201-11.
66. Stephen M. *Biomineralization: principles and concepts in biorganic materials chemistry.* 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2005.
67. Mchugh TH, Avena-bustillos R, Krochta JM. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J Food Sci.* 1993; 58(4): 899-903.
68. Felton LA. Characterization of coating systems. *AAPS PharmSciTech.* 2007; 8: 258–66.
69. Silva MA, Bierhalz ACK, Kieckbusch TG. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca<sup>2+</sup> ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydr Polym.* 2009; 77: 736-42.
70. Ionescu ME, Ciocirlan M, Becheanu G, Nicolaie T, Ditescu C, Teiusanu AG. et al. Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *J Clin Med.* 2011; 6(3): 173-8.
71. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science.* 2001; 294(5547): 1684-8.
72. Nge TT, Sugiyama J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *J Biomater Res Part A.* 2007; 81(1): 124-34.
73. Chunling DA, Jun JA, Yucheng LA, Xiangdong KB, Kemin W, Juming Y. Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: structure and properties. *Mater Sci Eng C.* 2009; 29: 62–8.
74. Tseng YH, Tsai YL, Tsai TWT, Chao JCH, Lin CP, Huang SH, Mou CY, Chan JCC. Characterization of the phosphate units in rat dentin by solidstate NMR spectroscopy. *Chem Mater.* 2007; 19(25): 6088-94.
75. Sepulveda P, Bressiani AH, Bressiani JC, Mesequer L, Koniq JrB. In vivo evaluation of hydroxyapatite foams. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62(3): 587-9.
76. Vellayappan MV, Balaji A, Subramanian AP, John AA, Jaganathan SK, Murugesan S, et al. Multifaceted prospects of nanocomposites for cardiovascular grafts and stents. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10: 2785–803.
77. Chong MSK, Teoh SH, Teo EY, Zhang ZY, Lee CN, Koh S, Choolani M, Chan J. Beyond cell capture: antibody conjugation improves hemocompatibility for vascular tissue engineering applications. *Tissue Eng Part A.* 2010; 16(8): 23-7
78. Wang J, Wei Y, Yi H, Liu Z, Sun D, Zhao H. Cytocompatibility of a silk fibroin tubular scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 1(34): 429-36.
79. Moraes MA, Weska RF, Beppu MM. Effects of sterilization methods on the physical, chemical, and biological properties of silk fibroin membranes. *J Bio Mater Res B Appl Biomater.* 2014; 102(4): 869-76.
80. Rajkhowa R, Hu X, Tsuzuki T, Kaplan DL, Wang X. Structure and biodegradation mechanism of milled *B.mori* silk particles. *Biomacromolecules.* 2012; 13(8): 2503–12.

81. Numata K, Cebe P, Kaplan DL. Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals. *Biomaterials*. 2010; 31(10): 2926-33.
82. Kim J, Lee KW, Hefferan TE, Currier BL, Yaszemski MJ, Lu L. Synthesis and evaluation of novel biodegradable hydrogels based on poly(ethyleneglycol) and sebacic acid as tissue engineering scaffolds. *Biomacromolecules*. 2007; 9(1): 149–57.
83. He M, Chang C, Peng N, Zhang L. Structure and properties of hydroxyapatite/cellulose nanocomposite films. *Carbohydr Polym*. 2012; 87(4): 2512– 8.
84. Tazi N, Zhang Z, Messaddeq Y, Almeida-Lopes L, Zanardi LM, Levinson D, et al. Hydroxyapatite bioactivated bacterial cellulose promotes osteoblast growth and the formation of bone nodules. *AMB Express*. 2012; 22(2): 1-61.
85. Massari KV, Marinho GO, Silva JL., Holgado LA, Leão AL, Chaves MRM, et al. Tissue reaction after subcutaneous implantation of a membrane composed of bacterial cellulose embedded with hydroxyapatite. *Dent Oral Craniofac Res*. 2015; 1(2): 25-30.
86. Scarel-Caminaga RM, Saska S, Franchi LP, Santos RA, Gaspar AMMG, Capote TSOC, et al. Nanocomposites based on bacterial cellulose in combination with osteogenic growth peptide for bone repair: cytotoxic, genotoxic and mutagenic evaluations. *J Appl Biol Biotechnol*. 2014; 2(1): 1-8.
87. Moshaverinia A, Ansari S, Chen C, Xu X, Akiyama K, Snead ML, et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013; 34: 6572-9.
88. Pigossi SC, de Oliveira GJ, Finoti LF, Nepomuceno R, Spolidorio LC, Rossa C. et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. *J Bio Mater Res Part A*. 2015; 103(10): 3397-406.
89. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One*. 2014; 9(8):1-9.
90. Guex AG, Puetzer JL, Armgarth A, Littmann E, Stavrinidou E, Giannelis EP, et al. Highly porous scaffolds of PEDOT:PSS for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2017; 15(62): 91-101.
91. Calasans-Maia MD, Melo BR, Alves AT, Resende R, Louro RS, Sartoretto SC, et al. Cytocompatibility and biocompatibility of nanostructured carbonated hydroxyapatite spheres for bone repair. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(6):599-608.
92. Zaborowska M, Bodin A, Bäckdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater*. 2010; 6(7): 2540-7.
93. Luppen CA, Smith E, Spevak L, Boskey AL, Frenkel B. Bone morphogenetic protein-2 restores mineralization in glucocorticoid-inhibited MC3T3-E1 osteoblast cultures. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(7): 1186-97.
94. Zimmermann KA, LeBlanc JM, Sheets KT, Fox RW., Gatenholm P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Mater Sci Engin C*. 2011; 31(1): 43-9.
95. Kato K, Otsuka T, Kondo A, Matsushima-Nishiwaki R, Natsume H, Kozawa O, et al. AMP-activated protein kinase regulates PDGF-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: involvement of mitogen-activated protein kinases. *Life Sci*. 2012; 90(1-2):71-6.

96. Franchimont N, Wertz S, Malaise M. Interleukin: an osteotropic factor influencing bone formation. *Bone*. 2005; 37:601-6.
97. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016; 86: 119–30.
98. Dodds RA, Merry K, Littlewood A, Gowen M. Expression of mRNA for IL1p, IL6 and TGF /31 in developing human bone and cartilage. *Cytochemistry*. 1994; 42: 733-44.

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de defesa**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 23 de fevereiro de 2018**

**Fernanda Coelho**