

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/02/2020.



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: Ticiania 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: Ticiania 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 *SPP1*, *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 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 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 1º ao dia 14º 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 *SPP1* (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. *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, 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- β dos grupos G1, G2 e G4 nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Barras indicam a quantidade detectada de TGF- β 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 ^a indica diferença estatisticamente significativa em relação ao CN ($p < 0,0001$), Dunnett. ^b = $p < 0,0001$, 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- β - Ttransformation Growth Factor – β

TNFRSF11B -Osteoprotegerina

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial

SUMÁRIO

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

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	50
4.2 Caracterização das Membranas	52
4.3 Ensaios in Vitro para Investigação de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade	60
4.4 Estudos de Adsorção de Anticorpos in Vitro	69
4.5 Expressão Gênica	71
4.6 Detecção da Formação de Nódulos Minerais por Coloração com Vermelho de Alizarina	76
4.7 Atividade da Proteína Fosfatase Alcalina (ALP)	79
4.8 Quantificação da Produção de IL-6 e TGF-β por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	80
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93

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 suporte¹. 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 total².

A regeneração óssea é um processo altamente eficiente e fortemente regulado que envolve todos os componentes do tecido ósseo³. 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 ósseo⁴.

O processo de regeneração óssea transcorre sem complicações na maioria dos casos (90 a 95%)⁵. 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 óssea³.

O enxerto ósseo é um procedimento cirúrgico comumente realizado para aumentar a regeneração óssea em uma variedade de procedimentos ortopédicos e maxilofaciais⁶, sendo o osso autólogo considerado o material "padrão-ouro" de enxerto ósseo^{4,2,7,6,8}. 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 osteocondução⁶. 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 enxerto³, as quais aumentam com a quantidade de osso colhido². 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 patógenos².

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 adequada⁸.

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^{3,8}.

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 biomateriais⁸.

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 biológica⁹.

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 dissulfeto¹⁰. Essas cadeias são revestidas por uma proteína hidrofílica chamada sericina que representa 25-30% do casulo total do bicho-da-seda¹¹. 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%)¹². Esses aminoácidos mediam interações importantes entre células de mamíferos e a matriz extracelular, facilitando a adesão e o crescimento celular¹⁰.

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 orgânico¹¹ e apresenta atividade antimicrobiana¹⁰.

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 materiais¹¹.

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 μm ¹⁰.

A celulose sintetizada pelas bactérias é microcristalina, apresenta capacidade de absorção de água superior à celulose vegetal e apresenta maior resistência mecânica quando hidratada¹³. 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 mecânica¹⁴. A CB pode ser produzida em quase qualquer forma devido à sua elevada moldabilidade durante a formação¹⁰. Propriedades únicas que a fazem ser um biopolímero com grande potencial a ser explorado pela biotecnologia, e outras áreas da ciência biomédica¹⁵.

Membranas de CB não foram citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas em células CHO-K1¹⁶, assim como membranas de FS não apresentaram citotoxicidade e proporcionaram o crescimento de células fibroblásticas, bem como mantiveram as funções celulares¹⁷.

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 natural⁸.

A HA apresenta propriedades biológicas como biocompatibilidade e osteocondução¹⁸. 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 implantados¹⁹.

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 ósseo²⁰, 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 metálicos²¹, exemplificado pela HA que tem boa bioatividade e osteocondutividade, porém é muito frágil e apresenta baixa resistência à tração²².

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^{23, 24}.

Partículas de HA nanométricas estão associadas a um nível menor de citotoxicidade in vitro com boas ligações celulares e crescimento de osteoblastos humanos^{25,8}.

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 ósseo²⁶ mostrando resultados promissores para a regeneração óssea^{27, 26, 28}.

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 óssea²⁹.

1.3 Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs)

Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs do termo em inglês – *bone morphogenetic proteins*) pertencem à família TGF- β (*transformation growth factor – β*)³ 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 osteoindutoras².

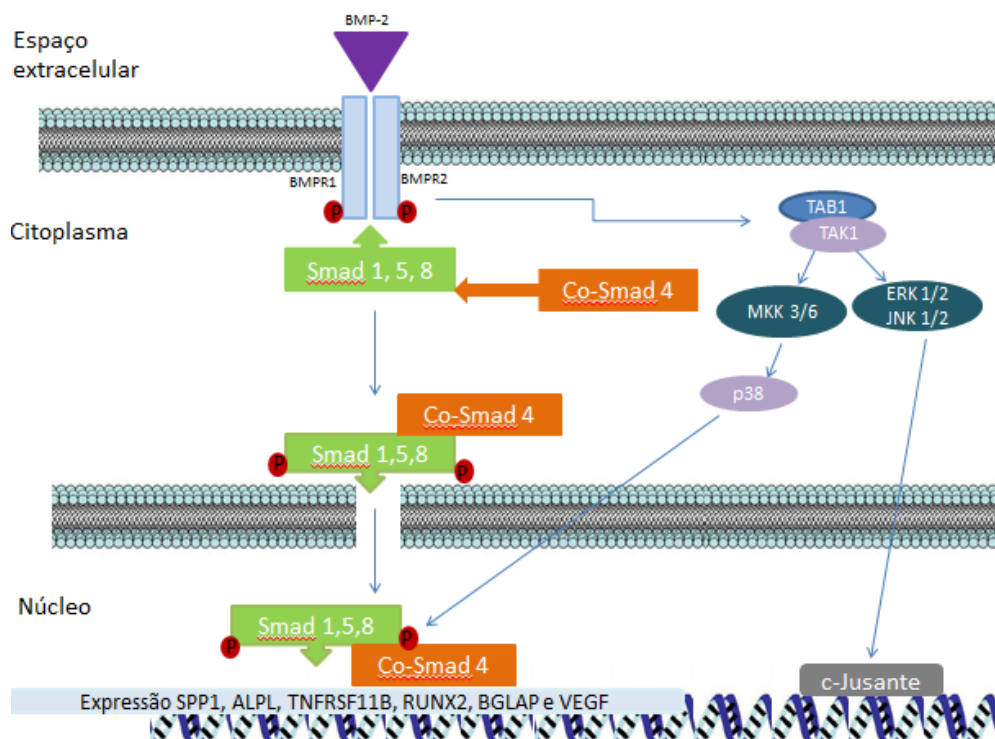
O principal papel das BMPs é o recrutamento de células mesenquimais para o local de cicatrização e, em seguida, diferenciá-las em linhagem osteogênica, resultando em nova

formação óssea ^{2,8}. A BMP-2 desempenha um papel importante na expressão de marcadores osteogênicos como *Fosfatase Alcalina*, do inglês- *alkaline phoasphatase (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 humanos².

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 (BMPR1) e receptores BMP tipo 2 (BMPR2). 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*)³⁰.

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)*²⁵. 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.³ 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 dispositivos³.

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 substâncias³.

Proteínas recombinantes produzidas a partir da clonagem de BMPs humanas (rhBMPs - proteínas morfogenéticas recombinantes humanas) demonstraram capacidade para induzir a formação óssea³¹. Estas foram aprovadas pela FDA (Food and Drug Administration), resultando em uma rápida aceitação para reparação de fraturas ósseas³².

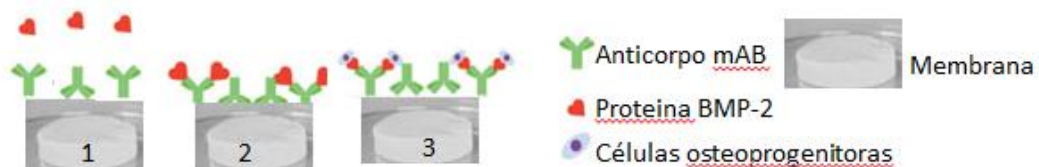
BMP/INFUSE (rhBMP-2) (Medtronic, Memphis, TN e EUA) foi aprovado pela FDA em 2002 como uma alternativa ao enxerto ósseo autólogo para fusões de vértebras lombares. Foi observado que efeitos adversos graves podem ocorrer após o uso de rhBMP-2 nas cirurgias de coluna vertebral. Complicações in vivo e in 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 catabolismo³³. De acordo com Epstien³³, 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-benefício³⁴. 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 endógeno³⁵.

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 feridas³⁵. 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*)³⁵. 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.³⁵ 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.³⁶ 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 estável³⁷. 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-letais³⁸. 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 espectrofotômetro³⁹. 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 substância³⁸.

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 celular⁴⁰.

Descrito por Singh et al.⁴¹ 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 molécula⁴¹.

Segundo Darroudi e Natarajan⁴², 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 mutagênico⁴³.

De acordo com Poersch et al.⁴⁴ 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 mitótico⁴⁵.

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 ratos⁴⁶. 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 investigação⁴⁷.

Como já descrito por Huang et al.²⁵ e por Rath et al.³⁰, 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* (*SPP1*), *fosfatase alcalina* (*ALPL*), *osteoprotegerina* (*TNFRS11B*), *RUNX2*, *osteocalcina* (*BGLAP*) e do *fator de crescimento endotelial* (*VEGF*).

O gene *SPP1*, 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 vibronectina de osteoclastos é encontrado na membrana celular e pode estar envolvido na ligação a esta proteína⁴⁸. 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 hipofosfatasia, uma desordem caracterizada por hipercalcemia e defeitos esqueléticos⁴⁹.

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 osteoclastos⁵⁰.

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 ósseo⁵¹.

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 hidroxiapatita⁵². 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 patológica⁵³.

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.

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 *SPP1*, *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, Lustri 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- ϵ -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 β -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 β -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, Almohaimeed 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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.