

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/03/2018.



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



MARIANA ALINE COMINOTTE

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE DIFERENTES
SCAFFOLDS À BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E
POLIHIDROXIBUTIRATO-CO-VALERATO**

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



MARIANA ALINE COMINOTTE

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE DIFERENTES
SCAFFOLDS À BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E
POLIHIDROXIBUTIRATO-CO-VALERATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Joni Augusto Cirelli

Co-orientadora: Sybele Saska Specian

Araraquara

2016

Cominotte, Mariana Aline

Análises físico químicas e biológicas de diferentes Scaffolds à base de Polihidroxibutirato e Polihidroxibutirato-co-valerato/ Mariana Aline Cominotte.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

70 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Co- orientadora: Dr. Sybele Saska Specian

1. Bioimpressão 2. Polímeros 3. Celulose bacteriana 4. Apatitas
5. OGP 6. Lantânio I. Título

MARIANA ALINE COMINOTTE

**ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DE DIFERENTES
SCAFFOLDS À BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E
POLIHIDROXIBUTIRATO-CO-VALERATO**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Comissão julgadora

Presidente e Orientador Joni Augusto Cirelli

2º Examinador Raquel Scarel Caminaga

3º Examinador Willian Fernando Zambuzzi

Araraquara 29 de Março de 2016

DADOS CURRICULARES

MARIANA ALINE COMINOTTE

NASCIMENTO: 31/ 05/ 1988 – Araraquara- São Paulo

FILIAÇÃO: Kelly Kassia Ferreira Cominotte e Carlos Alberto Cominotte

2008/ 2012: Graduação em Odontologia

Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr – UNESP.

2014/ 2016: Curso de pós- graduação em Odontologia, área de concentração
Periodontia, nível Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr – UNESP.

2015/ : Especialização em Periodontia

Faculdade de Odontologia de Araraquara- FOAr – UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos amores de minha vida: Mamãe, Papai, Alexandre Cominotte e Alexandre Carmargo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me abençoado durante todos os momentos desta etapa em minha vida, e por ter colocado em meu caminho pessoas especiais com as quais convivi durante o mestrado.

Aos meus pais Kelly e Carlos, meu irmão Alexandre, pessoas maravilhosas que amo incondicionalmente, que me apoiaram e incentivaram durante todos os momentos de minha vida. Sem vocês não seria possível chegar até aqui.

Ao meu amor, Alexandre, pelo apoio, incentivo, atenção, e compreensão, durante os momentos bons e ruins desta fase. Meu melhor amigo e confidente, sua presença foi indispensável para mim.

A minha tia Arary, pessoa maravilhosa enviada por Deus, que me acolheu, incentivou e cuidou de mim. Por todos os acontecimentos, e pela fase mais difícil em sua vida a qual fiz parte, és para mim exemplo de vida.

As pessoas especiais que convivem e compartilham comigo todos os momentos, em especial minha avó e tia Lili, Janaina, Josaine, Danielly, Mariângela, Estevam, Mariana, Paulo, Stefan e Jackeline. É um prazer conviver com vocês, obrigada pelo carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, pelo exemplo de pessoa, educador e pesquisador, também por toda dedicação e paciência. A minha co-orientadora Dra. Sybele Saska Specian, pelo trabalho e ensinamento.

As colegas de trabalho que colaboraram com essa pesquisa, Fernanda Florian, Luana Carla Pires Verzola, Andressa Vilas Boas, obrigada pelos ensinamentos, dedicação e paciência. As colegas Leslie Fiori, Sabrina Frasnelli e Sâmara Corbi, obrigada pela parceria e companheirismo.

Aos professores da FOAr-UNESP em especial Profa. Dra. Adriana Marcantonio, Prof. Dr. José Eduardo Sampaio, Prof. Dr. Carlos Rossa, Prof. Dr. Elcio Marcantonio, Profa. Dra. Silvana Orrico e Profa. Dra. Daniela Zandim, obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Aos funcionários da FOAr-UNESP, em especial Isa, Leandro, Claudinha, Zezé, D. Maria, Suleima, as quais sou muito grata por toda ajuda, para o desenvolvimento de meu trabalho.

Aos membros titulares da banca examinadora, Prof. Dr. Willian Zambuzzi e Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga, e aos membros suplentes, Profa Dra. Ana Paula Faloni e Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza, agradeço a disponibilidade e contribuições ao nosso trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e institucional através do processo 2013/23873-0, que possibilitou a realização das etapas de minha pesquisa.

RESUMO

Com a evolução no desenvolvimento de biomateriais, a utilização de matrizes tridimensionais (*scaffolds*), construídas a partir de impressão tridimensional (3DP), via SLS (*selective laser sinterization*) e por Extrusão de Filamentos, vêm ganhando bastante destaque no ramo da engenharia tecidual óssea. A possibilidade de impressão de modelos 3D, baseado em modelo virtual prévio, com forma, tamanho, e porosidade altamente controlados, assemelha o material ao osso perdido, favorecendo a reconstrução de defeitos ósseos em substituição aos autoenxertos, considerados “padrão ouro”. O objetivo deste trabalho foi caracterizar físico-química e biologicamente *scaffolds* à base de Poli(3-hidroxibutirato) (PHB), confeccionados por impressão 3D via SLS, revestidos com celulose bacteriana (CB), funcionalizados ou não com apatitas (HA) e/ou peptídeo de crescimento osteogênico (*osteogenic growth peptide - OGP*) (Estudo 1), assim como matrizes de Poli(hidroxibutirato-co-valerato) (PHBV) e PHBV-apatita radiopaca dopada com Lantânio (PHBV-La₂₀OAP) confeccionadas por Extrusão de Filamentos (Estudo 2), com finalidade de regeneração óssea. Os resultados de caracterização físico-química por meio da MEV/EDS demonstraram que os *scaffolds* produzidos apresentaram composição química e arquitetura (forma e porosidade) adequadas. A resistência mecânica nos *scaffolds* de PHB não sofreu alteração significativa após o revestimento com CB; porém, teve redução com a adição de apatita. O lantânio promoveu um aumento do módulo de elasticidade das matrizes de PHBV. Experimentos para análise do comportamento biológico dos *scaffolds* demonstraram que estes permitiram a manutenção da viabilidade, proliferação e espriamento celular semelhante em todos os grupos, com exceção do PHB(CB-HA)-OGP que demonstrou atraso na proliferação celular durante todos os períodos. Houve a formação de nódulos minerais pelas células sobre os *scaffolds* do Estudo 1 e 2. As matrizes pertencentes ao Estudo 2 permitiram a expressão pelas células de genes relacionados à mineralização óssea. Sendo assim, estes resultados, sugerem que os *scaffolds* avaliados nos Estudos 1 e 2 são promissores para a utilização em procedimentos de regeneração óssea.

Palavras-chave: Bioimpressão. Polímeros. Celulose bacteriana. Apatitas. OGP. Lantânio.

ABSTRACT

With the evolution in the development of biomaterials, the use of three-dimensional matrices (scaffolds), constructed from three-dimensional printing (3DP) via SLS (selective laser sinterization) and Filament Extrusion are gaining a lot of attention in the field of bone tissue engineering. The possibility to print 3D models based on previous virtual models with highly controlled shape, size and porosity, makes the material similar to the lost bone and favours the reconstruction of bone defects in the replacement of autografts considered "gold standard". The aim of this study was to physicochemically and biologically characterize Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) scaffolds, made by 3D printing via SLS coated with bacterial cellulose, functionalized or not with apatite (HA) and / or osteogenic growth peptide- (OGP) (Study 1) and matrices of Poly (hydroxybutyrate-co-valerate) (PHBV) and PHBV-La containing radiopaque apatite (PHBV-La20OAP) made by filament extrusion (Study 2) for bone regeneration. Results from physicochemical characterization by SEM/EDS demonstrated that the all produced *scaffolds* presented appropriate chemical composition and architecture (shape and porosity). The mechanical strength of the PHB scaffolds was not significantly affected by CB coating but was reduced after apatite addition. The La allowed an increase in the elasticity modulus of PHBV matrices. Experiments for analysis of the biological behaviour of the *scaffolds* showed that they allowed the maintenance of the viability, proliferation and similar cell spreading in all groups, with exception to the PHB(CB-HA)-OGP, which showed delayed cell proliferation during all periods. Mineral nodules were produced by cells on all *scaffolds* from both studies. Matrices from Study 2 allowed the expression of genes related to bone mineralization. Therefore, these results suggest that *scaffolds* evaluated in Studies 1 and 2 are promising for use in bone regeneration procedures.

Keywords: Bioprinting. Polymers. Bacterial cellulose. Apatites. OGP. Lanthanum.

LISTA DE ABREVIATURAS

Alp: *Alkaline Phosphatase* - Fosfatase alcalina

Bglap: *Bone Gamma-Carboxyglutamate (Gla) Protein* - Osteocalcina

CB: Celulose Bacteriana

Col1a1: Colágeno tipo 1- alfa 1

EDS: *Energy- dispersive x-ray spectroscopy* (espectroscopia de energia dispersiva de raios-x)

FBS: *Fetal bovine serum* (soro fetal bovino)

Gapdh: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

HA: Hidroxiapatita

HBMSC: *Human bone marrow stromal cell* (célula de medula óssea humana)

La: Lantânio

MC3T3-E1: *Mouse osteoblastic cell line* (células de linhagem osteoblástica de rato)

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

OCP: Fosfato octacálcio

OGP: *Osteogenic growth peptide* (peptídeo de crescimento osteogênico)

P/S: *Penicillin/ streptomycin* (penicilina/ estreptomicina)

PBHV-La₂₀Oap: Polihidroxibutirato-co-valerato apatita dopada com lantânio

PBS: *Phosphate- buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PCL: Policaprolactona

PGA: Ácido poliglicólico

PHA: Polihidroxialcanoatos

PHB: Polihidroxibutirato

PHBV: Polihidroxibutirato-co-valerato

PLA: Ácido polilático

PR: Prototipagem rápida

PVC: Policloreto de vinila

RBMSC: *Rat bone marrow stem cell* (célula de medula óssea de ratos)

Runx2: *Runt-related transcription factor 2* (Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt)

SLS: *Selective Laser Sintering* (sinterização seletiva a laser)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAL E MÉTODO	22
5 RESULTADO	35
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
ANEXO.....	70

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o aumento na busca por maior qualidade e expectativa de vida tem estimulado o desenvolvimento de novos materiais biocompatíveis e bioabsorvíveis para diversas aplicações clínicas. Dentro deste contexto a engenharia tecidual tem proporcionado grandes avanços com relação ao desenvolvimento de biomateriais tridimensionais (3D) para reconstrução de defeitos de tecido ósseo, relacionados às enfermidades congênitas, traumas ou lesões oncológicas. Contudo, os autoenxertos ósseos, obtidos de áreas doadoras do próprio indivíduo, ainda são considerados “padrão ouro” para reconstrução destes defeitos, devido às suas características biológicas favoráveis^{37, 82, 17}.

Os autoenxertos possuem três propriedades primordiais: osteocondução, osteoindução e osteogênese⁵¹, além do benefício da ausência de rejeição imunológica. Porém a utilização destes enxertos pode resultar em algumas desvantagens como: 1. Quantidade e áreas doadoras limitadas; 2. Potencial de morbidade da área doadora; 3. Considerável reabsorção; 4. Viabilidade limitada por causa da escassez de vascularização em caso de enxertos não vascularizados; 5. Tempo cirúrgico adicional⁹.

Além disso, as potenciais áreas doadoras: fíbula, escápula, crista ilíaca e rádio, apresentam uma maior morbidade após os procedimentos cirúrgicos, além de cada região receptora a ser reconstruída exigir certos cuidados com relação à forma, função, e vascularização do enxerto ósseo⁵¹.

Como alternativa aos autoenxertos temos os xenoenxertos (obtidos de espécie distinta) e os aloenxertos (obtidos de outro indivíduo), que por sua vez necessitam de cuidados especiais para que haja a diminuição dos riscos de transmissão de infecção e ativação do sistema imunológico do hospedeiro, que pode ocasionar incompatibilidade biológica e consequente rejeição do enxerto²⁴.

Os enxertos de origem sintética podem ser à base de polímeros naturais e de origem sintética, cerâmicas incluindo biovidros, metal e compósitos. Estes materiais visam substituir os enxertos autógenos mimetizando sua composição mineral e sua estrutura (trabeculado ósseo). Os materiais sintéticos possuem algumas vantagens e desvantagens; como exemplo do material mais utilizado atualmente, as cerâmicas associadas aos fosfatos de cálcio possuem baixo custo, osteocondutividade, e boa

compatibilidade. Entretanto quando comparadas ao osso possuem baixa dissolução e pouca osteoindução⁴⁰.

Devido às desvantagens dos autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos a engenharia tecidual e a biotecnologia buscam o desenvolvimento de novos biomateriais e métodos para reparação dos tecidos perdidos, principalmente o tecido ósseo. Com isso, os substitutos ósseos sintéticos e/ou processados biotecnologicamente tornaram-se biomateriais potenciais para aplicações clínicas nas diversas áreas da saúde.

7 CONCLUSÃO

Baseado nos estudos iniciais realizados *in vitro* e apresentados nesta dissertação, concluímos que:

1) As impressões do tipo 3D através da Sinterização Seletiva a Laser, e por Extrusão de Filamentos dos Estudos 1 e 2, para a produção dos *scaffolds* de poli(3-hidroxi-butirato) e poli(hidroxi-butirato-co-valerato), foram eficazes na confecção das matrizes tridimensionais para aplicação em defeitos ósseos, com relação à morfologia e propriedades físico-químicas desejadas e avaliadas: características superficiais microscópicas, composição química e resistência mecânica.

2) No Estudo 1 os *scaffolds* de PHB revestidos com CB associados ao OGP (PHB-CB-OGP) apresentaram-se favoráveis à mineralização da matriz óssea, enquanto que os *scaffolds* associados ao HA [PHB(CB-HA)-OGP] apresentou redução de suas propriedades mecânicas bem como biológicas. A associação do La aos *scaffolds* de PHB do Estudo 2 permitiu a confecção de matrizes tridimensionais com radiopacidade satisfatória, porém não apresentou efeito físico-químico e biológico adicional.

REFERÊNCIAS*

1. Abukawa H, Papadaki M, Abulikemu M, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. *Dent Clin North Am.* 2006; 50(2): 205-16.
2. Aoki H. Science and medical applications of hydroxyapatite. Universidade de Michigan: JAAS; 1991. 214 p.
3. Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrad A, Shteyer A, Greenberg Z, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. *Embo J.* 1992; 11(5): 1867-73.
4. Bab IA. Regulatory role of osteogenic growth peptide in proliferation, osteogenesis, and hemopoiesis. *Clin Orthop Relat Res.* 1995; (313): 64-8.
5. Bernardo JR. Indirect tissue scaffold fabrication via additive manufacturing and biomimetic mineralization [dissertação de mestrado]. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University; 2010.
6. Bonartsev A, Myshkina V, Nikolaeva D, Furina E, Makhina T, Livshits V, et al. Biosynthesis, biodegradation, and application of poly (3-hydroxybutyrate) and its copolymers-natural polyesters produced by diazotrophic bacteria. Badajoz: A. Méndez Vilas; 2007. p. 295-307.
7. Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater Today.* 2013; 16(12): 496-504.
8. Brager MA, Patterson MJ, Connolly JF, Nevo Z. Osteogenic growth peptide normally stimulated by blood loss and marrow ablation has local and systemic effects on fracture healing in rats. *J Orthop Res.* 2000; 18(1): 133-9.
9. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983; (174): 28-42.
*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver.
Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

10. Caraschi JC, Ramos UM, Leão AL. Compósitos biodegradáveis de polihidroxibutirato (PHB) reforçado com farinha de madeira: propriedades e degradação. *Acta Sci Technol.* 2002; 24: 1609-14.
11. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br.* 1960; 42-B: 28-30.
12. Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials.* 2005; 26(33): 6565-78.
13. Chen Y, Xi T, Zheng Y, Guo T, Hou J, Wan Y, et al. In vitro cytotoxicity of bacterial cellulose scaffolds used for tissue-engineered bone. *J Bioact Compat Polym.* 2009; 24(1): 137-45.
14. Chen YC, Bab I, Mansur N, Muhlrad A, Shteyer A, Namdar-Attar M, et al. Structure-bioactivity of C-terminal pentapeptide of osteogenic growth peptide [OGP(10-14)]. *J Pept Res.* 2000; 56(3): 147-56.
15. Choi J-i, Lee SY. High-level production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(10): 4363-8.
16. Ciobanu G, Ilisei S, Luca C. Hydroxyapatite-silver nanoparticles coatings on porous polyurethane scaffold. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2014; 35: 36-42.
17. Colnot C, Zhang X, Knothe Tate ML. Current insights on the regenerative potential of the periosteum: molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res.* 2012; 30(12): 1869-78.
18. Czaja W, Romanovicz D, Malcolm Brown R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose.* 2004; 11(3-4): 403-11.

19. DiGirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *BR J Haematol.* 1999; 107(2): 275-81.
20. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011; 9: 66.
21. Duan B, Cheung WL, Wang M. Optimized fabrication of Ca-P/PHBV nanocomposite scaffolds via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Biofabrication.* 2011; 3(1): 015001.
22. Duan B, Wang M, Zhou WY, Cheung WL, Li ZY, Lu WW. Three-dimensional nanocomposite scaffolds fabricated via selective laser sintering for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2010; 6(12): 4495-505.
23. 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.
24. Farrington M, Matthews I, Foreman J, Caffrey E. Bone graft contamination from a water de-ionizer during processing in a bone bank. *J Hosp Infect.* 1996; 32(1): 61-4.
25. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004; 329(1): 77-84.
26. Guo DG, Wang AH, Han Y, Xu KW. Characterization, physicochemical properties and biocompatibility of La-incorporated apatites. *Acta Biomater.* 2009; 5(9): 3512-23.
27. He J, Soderling E, Lassila LV, Vallittu PK. Incorporation of an antibacterial and radiopaque monomer into dental resin system. *Dent Mater.* 2012; 28(8): e110-7.

28. Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res.* 1998; 41(4): 511-8.
29. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science.* 2002; 295(5557): 1014-7.
30. Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2011; 32(36): 9622-9.
31. Hornung M, Biener R, Schmauder HP. Dynamic modelling of bacterial cellulose formation. *Eng Life Sci.* 2009; 9(4): 342-7.
32. Hu S-G, Jou C-H, Yang M-C. Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid). *Carbohydr Polym.* 2004; 58(2): 173-9.
33. Hutchens SA, Benson RS, Evans BR, Rawn CJ, O'Neill H. A resorbable calcium-deficient hydroxyapatite hydrogel composite for osseous regeneration. *Cellulose.* 2009; 16(5): 887-98.
34. Jiang W, Chen D, Hao L, Meng X. Influence of light REE compound (LaCl₃) on the growth of liver cancer cells. *Stud Trace Elem Health.* 2005; 22(3): 1-3.
35. Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005; 26(27): 5474-91.
36. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2005; 44(22): 3358-93.
37. Kluppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: a histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(4): 1074-7.

38. Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *J Biomed Mater Res.* 1990; 24(6): 721-34.
39. Kumarasuriyar A, Jackson R, Grøndahl L, Trau M, Nurcombe V, Cool S. Poly (β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis. *Tissue Eng.* 2005; 11(7-8): 1281-95.
40. LeGeros RZ. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. *Chem Rev.* 2008; 108(11): 4742-53.
41. Lemons JE, Lucas LC. Properties of biomaterials. *J Arthroplasty.* 1986; 1(2): 143-7.
42. Leone FA, Ciancaglini P, Pizauro JM. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. *J Inorg Biochem.* 1997; 68(2): 123-7.
43. Liu H, Raghavan D, Stubbs J. Evaluation of the biological responses of osteoblast- like UMR- 106 cells to the engineered porous PHBV matrix. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81(3): 669-77.
44. Lu LX, Wang YY, Mao X, Xiao ZD, Huang NP. The effects of PHBV electrospun fibers with different diameters and orientations on growth behavior of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Mater.* 2012; 7(1): 015002.
45. Malone E, Lipson H. Fab@ Home: the personal desktop fabricator kit. *Rapid Prototyp J.* 2007; 13(4): 245-55.
46. Maniopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.* 1988; 254(2): 317-30.
47. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, et al. Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials.* 2006; 27(17): 3230-7.

48. Mazzoli A. Selective laser sintering in biomedical engineering. *Med Biol Eng Comput.* 2013; 51(3): 245-56.
49. Miller N, Williams D. On the biodegradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly- β -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials.* 1987; 8(2): 129-37.
50. Montesinos J, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzman P, Hernandez-Estevez E, Fajardo-Orduna G, et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy.* 2009; 11(2): 163-76.
51. Myeroff C, Archdeacon M. Autogenous Bone Graft: Donor Sites and Techniques. *J Bone Joint Surg Am.* 2011; 93(23): 2227-36.
52. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface.* 2008; 5(27): 1137-58.
53. Nazarian A, Stauber M, Zurakowski D, Snyder BD, Muller R. The interaction of microstructure and volume fraction in predicting failure in cancellous bone. *Bone.* 2006; 39(6): 1196-202.
54. Nge TT, Sugiyama J. Surface functional group dependent apatite formation on bacterial cellulose microfibrils network in a simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81(1): 124-34.
55. Oliveira MF, Maia IA, Noritomi PY, Nargi GC, Silva G, Ferreira BM, et al. Construção de Scaffolds para engenharia tecidual utilizando prototipagem rápida. *Matéria (Rio J).* 2007; 12(2): 373-82.
56. Oliveira SM, Mijares DQ, Turner G, Amaral IF, Barbosa MA, Teixeira CC. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Eng Part A.* 2009; 15(3): 635-43.

57. Pavinato VP. Estudo da solubilidade de apatitas em meios de interesse biológico [dissertação de mestrado]. Araraquara: Instituto de Química da UNESP; 2012.
58. Pigossi SC, de Oliveira GJ, Finoti LS, Nepomuceno R, Spolidorio LC, Rossa C, Jr., et al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103(10): 3397-406.
59. Prakasam M, Locs J, Salma-Ancane K, Loca D, Largeteau A, Berzina-Cimdina L. Fabrication, properties and applications of dense hydroxyapatite: a review. *J Funct Biomater*. 2015; 6(4): 1099-140.
60. Putra A, Kakugo A, Furukawa H, Gong JP, Osada Y. Tubular bacterial cellulose gel with oriented fibrils on the curved surface. *Polymer*. 2008; 49(7): 1885-91.
61. Rajaraman R, Rounds DE, Yen SP, Rembaum A. A scanning electron microscope study of cell adhesion and spreading in vitro. *Exp Cell Res*. 1974; 88(2): 327-39.
62. Saska S, Barud HS, Gaspar AM, Marchetto R, Ribeiro SJ, Messaddeq Y. Bacterial cellulose-hydroxyapatite nanocomposites for bone regeneration. *Int J Biomater*. 2011; 2011: 175362.
63. Saska S, Scarel-Caminaga RM, Teixeira LN, Franchi LP, Dos Santos RA, Gaspar AM, et al. Characterization and in vitro evaluation of bacterial cellulose membranes functionalized with osteogenic growth peptide for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 23(9): 2253-66.
64. Senedese ALC, Lixandrão Filho A, Silva J, Inforçatti Neto P, Pereira F, Maciel Filho R. Additive manufacturing to build polycaprolactone scaffolds. In. *Proceedings of the 6th Brazilian Conference on Manufacturing Engineering*; 2011 April; Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Brazil: 2011. p. 11-15.
65. Seong JM, Kim B-C, Park J-H, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y-S. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater*. 2010; 5(6): 062001.

66. Serret A, Cabanas M, Vallet-Regi M. Stabilization of calcium oxyapatites with lanthanum (III)-created anionic vacancies. *Chem Mater.* 2000; 12(12): 3836-41.
67. Soballe K, Hansen ES, Brockstedt-Rasmussen H, Bunger C. Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1993; 75(2): 270-8.
68. Sun YQ, Ashhurst DE. Osteogenic growth peptide enhances the rate of fracture healing in rabbits. *Cell Biol Int.* 1998; 22(4): 313-9.
69. Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface.* 2009; 6(3): 311-24.
70. Utela B, Storti D, Anderson R, Ganter M. A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). *J Manuf Process.* 2008; 10(2): 96-104.
71. Vorndran E, Klammert U, Ewald A, Barralet JE, Gbureck U. Simultaneous immobilization of bioactives during 3D powder printing of bioceramic drug- release matrices. *Adv Funct Mater.* 2010; 20(10): 1585-91.
72. Wu GH, Hsu SH. Review: polymeric-based 3D printing for tissue engineering. *J Med Biol Eng.* 2015; 35(3): 285-92.
73. Wu LN, Ishikawa Y, Sauer GR, Genge BR, Mwale F, Mishima H, et al. Morphological and biochemical characterization of mineralizing primary cultures of avian growth plate chondrocytes: evidence for cellular processing of Ca^{2+} and Pi prior to matrix mineralization. *J Cell Biochem.* 1995; 57(2): 218-37.
74. Yang M, Zhu S, Chen Y, Chang Z, Chen G, Gong Y, et al. Studies on bone marrow stromal cells affinity of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials.* 2004; 25(7): 1365-73.

75. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 2001; 7(6): 679-89.
76. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng.* 2002; 8(1): 1-11.
77. Yasin M, Holland SJ, Jolly AM, Tighe BJ. Polymers for biodegradable medical devices. VI. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: accelerated degradation of blends with polysaccharides. *Biomaterials.* 1989; 10(6): 400-12.
78. Yoshikawa H, Tamai N, Murase T, Myoui A. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J R Soc Interface.* 2009; 6(3): S341-8.
79. Zaborowska M, Bodin A, Backdahl H, Popp J, Goldstein A, Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2010; 6(7): 2540-7.
80. Zhang J, Zhang T, Xu S, Wang K, Yu S, Yang M. Effects of lanthanum on formation and bone-resorbing activity of osteoclast-like cells. *J Rare Earth.* 2004; 22(6): 891-5.
81. Zhang L-J, Feng X-S, Liu H-G, Qian D-J, Zhang L, Yu X-L, et al. Hydroxyapatite/collagen composite materials formation in simulated body fluid environment. *Mater Lett.* 2004; 58(5): 719-22.
82. Zhang X, Xie C, Lin AS, Ito H, Awad H, Lieberman JR, et al. Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: implications for functional tissue engineering. *J Bone Miner Res.* 2005; 20(12): 2124-37.
83. Zimmermann KA, LeBlanc JM, Sheets KT, Fox RW, Gatenholm P. Biomimetic design of a bacterial cellulose/hydroxyapatite nanocomposite for bone healing applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2011; 31(1): 43-9.