



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 Polihidroxitirato e Polihidroxitirato-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.

Cominotte MA. Análises físico-químicas e biológicas de diferentes scaffolds à base de polihidroxibutirato e polihidroxibutirato-co-valerato [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016

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.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Biomateriais

Os biomateriais podem ser caracterizados como substâncias de origem natural ou sintética, as quais são aceitas pelos diversos tipos de tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos, devido à propriedade de biocompatibilidade. Dentre os materiais de origem natural destacam-se os enxertos ósseos e, dentre os materiais de origem sintética, destacam-se metais, ligas, cerâmicas, compósitos e alguns polímeros (Oliveira et al. ⁵⁶, 2009; Lemons, Lucas ⁴¹, 1986).

Para os biomateriais serem considerados ideais devem apresentar, além da biocompatibilidade, possibilidade de variação de formas e tamanhos, com resistência suficiente para serem utilizados em locais onde há incidência de carga e quando absorvíveis devem ser substituídos pela neoformação tecidual.

A introdução dos biomateriais na área médica e odontológica com objetivo de substituição e regeneração óssea ocorreu por volta da década de 60. Desde então, este campo de investigação da ciência vem crescendo consideravelmente, juntamente com os avanços da nanotecnologia, do desenvolvimento de novos métodos, técnicas de síntese, de elaboração e de caracterização dos mesmos.

A primeira geração de biomateriais com a proposta de regeneração óssea (década de 60) abrangia os materiais bioinertes, como, por exemplo, o aço inox e as ligas de titânio, considerados toleráveis pelo organismo (Charnley ¹¹, 1960).

A segunda geração de biomateriais surgiu por volta de 1980, representada pelos biomateriais bioativos e absorvíveis, entre eles as biocerâmicas de hidroxiapatita, fosfato tricálcio, os biovidros e alguns polímeros (Hench ²⁸, 1998).

No fim da década de 1990 surge a terceira geração de biomateriais, com características micro-estruturais, capacidade de interação molecular a nível celular, promovendo ligações com o tecido ósseo, apresentando boa dissolução do biomaterial e adsorção, promovendo a neoformação natural do tecido ósseo sendo representada pelas estruturas de compósitos e nanocompósitos (Hench, Polak ²⁹, 2002).

A quarta e última geração é associada à engenharia de tecidos e caracterizada pelo potencial de formação de tecidos moles e/ou duros através da confecção de arcabouços biodegradáveis no formato do tecido desejado, nos quais são

introduzidas células que, em condições adequadas, se multiplicam, e adquirem função específica para a formação do tecido desejado.

Polímeros

Os polímeros correspondem a um dos principais grupos de biomateriais disponíveis para reconstrução óssea. Eles podem ser de origem natural ou sintética, e sua principal característica é a biodegradabilidade. Os polímeros sintéticos (nylon, poliéster, polietileno e policloreto de vinila- PVC) em sua maioria são degradados por simples hidrólise, enquanto os polímeros naturais como a celulose são principalmente degradados enzimaticamente (Tabata ⁶⁹, 2009). Ambos, polímeros naturais e sintéticos, são utilizados na área médica pela engenharia tecidual para o desenvolvimento de moldes tridimensionais (*scaffolds*) para auxiliar na reparação de cartilagens, ligamentos, meniscos e discos intervertebrais, particularmente os polímeros sintéticos biodegradáveis (Navarro et al. ⁵², 2008).

Os principais polímeros utilizados com a finalidade de reparo do tecido ósseo são o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), ácido polihidroxibutirato (PHB) e a policaprolactona (PCL) (Zhang et al. ⁸¹, 2004; Chen, Wu ¹², 2005; Hutchens et al. ³³, 2009). Como vantagens estes materiais destacam-se pelo fácil controle de síntese, origem ilimitada, não sofrem degradação mediada por células, são biodegradáveis e biocompatíveis. Como desvantagens estudos demonstram que estes materiais possuem pouca resistência mecânica, superfície hidrofóbica, além da possibilidade de reação tóxica local pela liberação de produtos ácidos de degradação (Abukawa et al. ¹, 2006).

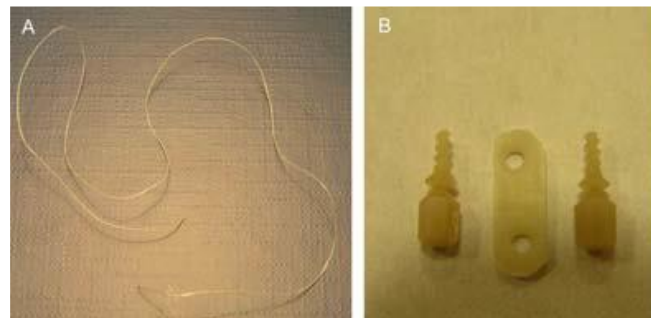
Poli (3-hidroxibutirato) – PHB

O PHB (C₄H₆O₂) é um biopolímero termoplástico, bioabsorvível, da família dos poli (hidroxialcanoatos) (PHA), poliésteres naturais e biodegradáveis, os quais podem sofrer degradação hidrolítica ou enzimática (Utela et al ⁷⁰, 2008). O PHB é produzido por meio de fermentação bacteriana, com predominância de utilização da bactérias *Ralstonia eutropha* (Karageorgiou, Kaplan ³⁵, 2005). Segundo alguns estudos estas bactérias quando mantidas em um meio enriquecido com excesso de carbono (glicose), armazenam a energia remanescente em forma de polímeros (Carashi et al ¹⁰, 2008).

A biossíntese deste polímero permite um processo cíclico sustentável por meio de fontes renováveis, substituindo tecnologias de ponta ligadas à produção e ao uso de materiais poliméricos sintéticos de fonte petroquímica, podendo substituir materiais como o polipropileno, poliestireno, polietileno e poli (cloreto de vinila) geradores de problemas ambientais devido ao tempo necessário para que ocorra degradação e a utilização de recursos não renováveis derivados do petróleo (Bose et al.⁷, 2013).

O PHB pode ser utilizado na odontologia como matriz tridimensional para condução da regeneração óssea e na área médica em suturas absorvíveis, placas ósseas, talas, microcápsulas, gazes, e ainda em forma de pó como lubrificante de luvas (Miller, Willians⁴⁹, 1987) (Figura 1).

Figura 1- Aplicações do PHB na medicina. A: Fio de sutura absorvível a base de PHB; B: Parafusos e placas de fixação óssea a cartilaginosa.



Autor Bornastev A. et al.⁶ (2007).

Fonte Communicating current research and educational topics and trend in applied microbiology. 2007; 1: 295-307.

Apesar da ampla utilização na engenharia tecidual, o PHB apresenta algumas desvantagens que limitam sua aplicação, devido ao alto teor de cristalinidade que pode vir a interferir na resistência mecânica do material, além de apresentar características hidrofóbicas (Chen, Wu¹², 2005).

PHBV - Poli(hidroxibutirato-co-valerato)

Frente às desvantagens apresentadas pelo PHB, como fragilidade e dificuldade de estabilidade térmica, uma alternativa para contornar parte desses problemas é a inserção do hidroxivalerato na estrutura do PHB (HU et al.³², 2004).

O poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) é uma variação do PHB, conhecido como PHBV, é um polímero do tipo poli-hidroxi-alcanoato (PHA) que não apresenta toxicidade, é termoplástico, biodegradável e biocompatível, produzido naturalmente por bactérias da espécie *Escherichia coli*, a partir da glucose e propionato (Choi, Lee¹⁵, 1999).

O PHBV é um material candidato a apoiar a regeneração óssea à longo prazo. Estudos in vivo tem demonstrado uma maior estabilidade quando comparado aos outros tipos de materiais poliméricos, uma vez que a liberação dos ácidos produzidos resultantes de sua degradação pode ser controlada, devido à permissão da alteração de sua massa molecular. Este processo gera ácidos que já se encontram presentes no organismo dos indivíduos, como, por exemplo, o ácido hidroxi-butírico, que é presente no sangue, e é metabolizado pelo fígado de forma segura (Yasin et al.⁷⁷, 1989).

O PHBV sendo um polímero termoplástico permite a confecção de matrizes tridimensionais (3D) interconectadas por poros, que podem induzir a osteocondução de células ósseas.

Com relação às propriedades mecânicas, o PHBV apresenta características semelhantes ao osso, que podem ser melhoradas quando acrescentada uma fase inorgânica à sua estrutura, exemplificadas pelas apatitas (He et al.²⁷, 2012).

Uma tendência no desenvolvimento de compósitos poliméricos para aplicações médicas e odontológicas é a associação com elementos nobres. O lantânio é um metal nobre de transição interna, encontrado no estado sólido, relativamente maleável e altamente reativo.

Atualmente é possível a obtenção de compostos poliméricos mais radiopacos por meio da adição de apatita dopada com lantânio (PHBV-La₂₀OAP), com objetivo de facilitar a visualização dos mesmos em diagnósticos por imagens. Além disso em alguns estudos com biocerâmicas contendo Lantânio (La), estes biomateriais não apresentaram citotoxicidade segundo Guo et al.²⁶ (2009), e permitiram a adesão de osteoblastos, não sendo observadas diferenças estatísticas com os grupos controles (biocerâmicas sem a associação com o lantânio) (Ergun et al.²³, 2009).

Scaffolds

Os *scaffolds* biologicamente ativos são constituídos por uma matriz de estrutura tridimensional e utilizados para a proliferação celular, atuando como “arcabouço” para a regeneração tecidual, simulando uma matriz extracelular, regulando fatores que promovem a condução, diferenciação no crescimento e formação de tecido ósseo (Karageorgiou, Kaplan ³⁵, 2005).

Com relação à sua composição, o material utilizado na confecção dos *scaffolds* deve ser biocompatível, absorvível, com produtos de dissolução/degradação metabolizados pelo organismo, osteocondutor e, quando possível, ter ação osteoindutora. Quanto à arquitetura, um *scaffold* deve ser altamente poroso com uma rede de poros interconectados para crescimento celular/tecidual permitindo o transporte de nutrientes e resíduos metabólicos, além de possuir propriedades mecânicas que atendam seu propósito (Wu, Hsu ⁷², 2015).

Para este trabalho foram planejadas e desenvolvidas estruturas 3D biocompatíveis e bioabsorvíveis, a partir da impressão por Prototipagem Rápida utilizando o PHB, revestido com celulose bacteriana, funcionalizado com apatitas e peptídeo osteogênico, além do PHBV ao qual foi incorporado apatita dopada com Lântanio, visando conferir melhores propriedades mecânicas, e biológicas aos polímeros PHB e PHBV.

Técnicas avançadas estão sendo recentemente desenvolvidas como alternativa aos métodos convencionais de confecção dos *scaffolds*, dentre elas: 1. Eletrofiação, técnica de fabricação baseada na nanotecnologia, e 2. Prototipagem Rápida, na qual o *scaffold* 3D é fabricado camada por camada até a obtenção do modelo final.

A Prototipagem Rápida (PR) é um dos métodos atuais mais novos de impressão de materiais em formato tridimensional (3D), totalmente computadorizado e amplamente utilizado na engenharia tecidual.

“*Additive fabrication*”, “*solid free form fabrication*”, “*3D printing*” e “*layer by layer fabrication*”, são outras denominações desta técnica. A principal vantagem deste método é a possibilidade do preparo de estruturas complexas, de maneira rápida, com riqueza de detalhes desde o formato anatômico desejado até a configuração do tamanho desejado dos poros da superfície do material (Yang et al. ^{75,76}, 2001, 2002).

Ainda dentro do contexto das técnicas de PR utilizadas na engenharia de materiais, enquadram-se as técnicas de “*Sheet lamination*” ou folha de laminação, a técnica da ligação adesiva e a técnica de sinterização à laser seletiva (*Selective Laser Sintering - SLS*), entre outras (Yang et al.⁷⁶, 2002).

A técnica de sinterização à laser seletiva (*SLS*) consiste no emprego de um laser de gás carbônico (CO₂) para sinterização seletiva do pó de polímero ou composto componente do *scaffold* 3D. Este processo visa a formação de camadas sucessivas do material, fixando umas sobre as outras, sendo empilhada, alinhada e aderida concomitantemente à anterior até que a peça final fique completa, criando desta forma um objeto tridimensional (Mazzoli⁴⁸, 2013).

Revestimentos bioativos / funcionalização dos *scaffolds*

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para modificar a superfície e as propriedades físico-químicas dos *scaffolds* à base de PHB para melhorar suas propriedades mecânicas, de biocompatibilidade, e tempo de reabsorção. Dentre estes métodos destaca-se a adição de fases inorgânicas ao polímero, como fosfatos de cálcio, por exemplo, a hidroxiapatita (Vorndran et al.⁷¹, 2010). Como também podem ser incorporados aos *scaffolds* de PHB o colágeno, celulose bacteriana e a fibroína da seda (FB) (Chen, Wu¹², 2005).

Celulose Bacteriana – CB

A celulose bacteriana (CB) é um material biológico na forma de hidrogel excretado por bactérias do gênero *Gluconacetobacter xylinus* (*Acetobacter xylinum*). As membranas de CB são constituídas por 99% de água, apresentam alta elasticidade e resistência a tração, mesmo quando molhadas (Czaja et al.¹⁸, 2004).

Diversos estudos tem sido realizados com tubos feitos à partir de CB com objetivo de substituir vasos sanguíneos, como por exemplo, veias safenas em cirurgias cardíacas, bem como a utilização de membranas de CB para revestimento de *scaffolds* tendo em vista a regeneração de cartilagem articular, rins e óssea segundo Zaborowska et al.⁷⁹ (2010) , dentro do contexto da engenharia tecidual (Holzwarth, Ma³⁰, 2011). Estas membranas tem sido utilizadas também no tratamento de queimaduras e feridas de

difícil cicatrização, pois criam uma barreira mecânica impedindo a contaminação por bactérias, permitindo a regeneração da área lesionada (Klemm et al.³⁶, 2005).

Estudos coordenados pelo Prof. Dr. Sidney J. Ribeiro do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista- UNESP, apresentam por meio de ensaios *in vitro* com membranas de CB, que demonstrando resultados negativos com relação à citotoxicidade (Saska et al.⁶³, 2012). Adicionalmente, a migração e a proliferação de fibroblastos e osteoblastos sobre a superfície do material não foram prejudicadas (Chen et al.¹³, 2009).

Uma maneira de potencializar o emprego da CB na engenharia tecidual seria revestir superfícies de estruturas 3D dando-lhe funcionalidade biológica inerentes à CB, por exemplo, confeccionando *scaffolds* para enxertia óssea com tamanho de poros adequados e regulares, produzidos por prototipagem rápida (PR) e recobertos com CB. Um *scaffold* desenvolvido desta forma tende a ser mais eficiente para a enxertia óssea do que os que são vistos na literatura, onde a porosidade é irregular e o tamanho dos poros varia dentro de uma faixa mensurada em μm (Zaborowska et al.⁷⁹, 2010). Entretanto mesmo com todas as vantagens descritas acima as membranas de CB (poros entre 300 - 500 μm), apresentam resistência mecânica desfavorável devido à baixa resistência à compressão e à tração, limitando sua aplicação para regeneração tecidual óssea.

Fosfatos de Cálcio

Atualmente os fosfatos de cálcio são um dos biomateriais mais estudados com o objetivo de auxiliar na reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam semelhança da fase mineral com tecidos calcificados, dentre eles ossos e dentes, além de serem bioativos, não tóxicos, e permitirem a osteocondutividade (LeGeros⁴⁰, 2008). Os fosfatos de cálcio são amplamente utilizados em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais de preenchimento e/ou reconstrução para a reparação do tecido ósseo.

Uma diversidade de métodos é utilizada na produção de revestimentos bioativos sobre materiais como *scaffolds* e implantes, incluindo pulverização de íons, ablação por laser, plasma spray, sol-gel, deposição eletroforética, métodos hidrotérmicos e métodos biomiméticos (Ciobanu et al.¹⁶, 2014).

Dentre os fosfatos de cálcio mais utilizados pela engenharia tecidual temos o fosfato dicálcio (DCP): CaHPO_4 , fosfato octacálcio: (OCP) $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6\text{5H}_2\text{O}$, fosfato tricálcio (TCP): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, e a hidroxiapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$. Todos estes podem ser sintetizados *in vitro* a partir da precipitação de íons Ca^{2+} e $[(\text{PO}_4)^{3-}]^2$.

A hidroxiapatita pertence ao grupo das apatitas [(fosfatos de cálcio com íons Hidróxido(OH-), Fluoreto(F-), e Cloreto(Cl-)], sendo o constituinte mineral natural presente nos ossos e dentes, compondo de 30 a 70% estes tecidos. O interesse em sua produção sintética é devido às características de biocompatibilidade e participação na osseointegração, propriedades estas que a tornam um material promissor substituto do osso humano em implantes e próteses.

A incorporação de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} à superfície dos *scaffolds* pode torná-la bioativa, podendo promover contato direto entre osso-material, com ausência de tecido conjuntivo entre as interfaces, levando a uma adequada fixação biomecânica (Soballe et al. ⁶⁷, 1993). Além disso, proporciona alta capacidade de adsorção e/ou absorção de moléculas, fazendo da hidroxiapatita um excelente suporte para permitir a ação prolongada de drogas (Prakasam et al. ⁵⁹, 2015).

Estudos realizados por Saska et al., ⁶² (2011) *in vivo* com matrizes de CB-HA demonstraram uma discreta reação inflamatória no período de 1 semana, o que gera uma alteração no pH da região prejudicando a atividade de osteoblastos. Contudo ao final da quarta semana houve a involução desta inflamação, consequentemente reestabelecimento do pH para condições ótimas, permitindo a ocorrência da neoformação óssea, e o preenchimento total dos defeitos, indicando desta forma que os polímeros associados a apatita podem ser utilizados para regeneração óssea.

Peptídeo de crescimento osteogênico (Osteogenic growth peptide – OGP)

O OGP é um peptídeo de ocorrência natural, cuja estrutura primária é idêntica à sequência C-terminal da histona H4 ($\text{NH}_3^+-\text{A-L-K-R-Q-G-R-T-L-Y-G-F-G-G-COO}-$) O OGP está presente em ligação com proteínas, formando complexos, tal como a $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -M). *In vivo*, o OGP regula a expressão dos fatores de crescimento de transformação beta (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ e TGF- $\beta 3$), fator de crescimento fibroblástico FGF-2 e fator de crescimento insulínico (IGF-1) segundo Brager et al.⁸

(2000), além de estar presente fisiologicamente no soro humano e de ratos, em concentrações muito pequenas indicando sua importância biológica (Bab et al. ³, 1992).

O OGP pode agir na diferenciação e/ou na proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e células osteoprogenitoras (Chen et al. ¹⁴, 2000).

Este peptídeo pode promover o aumento na densidade trabecular óssea, estimulando a cicatrização e permitindo que a atividade da fosfatase alcalina seja regulada, estimulando tanto a proliferação celular quanto a mineralização da matriz óssea ⁴. In vivo demonstraram que a administração sistêmica diária do OGP estimulou a ossificação endocondral em locais de fratura tanto em ratos quanto em coelhos, reduzindo o tempo da reparação óssea (Brager et al. ⁸, 2000).

Outro estudo de nosso grupo realizado em camundongos, nos quais foram criados defeitos ósseos críticos na região frontoparietal, realizaram-se tratamentos com membrana de celulose associadas ou não ao peptídeo OGP. Os resultados demonstraram tendência do aumento do gene responsável pelo início do reparo ósseo, sugerindo uma aceleração da diferenciação das células em osteoblastos, se comparados aos resultados do grupo tratado com membrana de CB sem a associação com o peptídeo OGP (Pigossi et al. ⁵⁸, 2015).

Além das técnicas de confecção, composições e funcionalizações de *scaffolds* descritos nesta breve revisão de literatura, muitos outros materiais tem sido propostos na literatura. Entretanto, mesmo com todos os avanços conquistados pela engenharia tecidual, ainda não foram desenvolvidos *scaffolds* à base de biomateriais totalmente capazes de mimetizar com precisão os autoenxertos na engenharia tecidual óssea. Portanto, novos estudos que desenvolvam e avaliem diferentes biomateriais e/ou técnicas que visem promover a regeneração tecidual, são relevantes na pesquisa médica e odontológica atual. Sendo assim, este trabalho visa o desenvolvimento de matrizes tridimensionais à base de PHB, funcionalizadas ou não com CB, CB-HA, OGP; bem como matrizes de PHBV funcionalizadas ou não com apatita dopada de lantânio, com o objetivo de promover adequada neoformação tecidual em regiões de defeitos ósseos.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as propriedades morfológicas, físico-químicas e biológicas de matrizes tridimensionais de poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) revestidas com celulose bacteriana (CB) funcionalizadas ou não com apatitas (HA) e/ou peptídeo osteogênico (OGP), bem como das matrizes de poli(hidroxi-butirato-co-valerato) (PHBV) e PHBV-apatita radiopaca (PHBV-La₂₀OAP), confeccionadas por meio da tecnologia de impressão 3D por Prototipagem Rápida (PR).

Objetivos Específicos

Realizar caracterizações morfológicas e físico-químicas para *scaffolds* de PHB e PHBV por meio de:

- Microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Resistência mecânica à compressão para os *scaffolds* de PHB.
- Análise dinâmico-mecânica por tensão (DMA) para os *scaffolds* de PHBV.

Analisar *in vitro* o comportamento de células mesenquimais de ossos longos cultivadas sobre os diferentes *scaffolds* à base de PHB e PHBV, por meio de:

- Morfologia celular.
- Viabilidade e proliferação celular.
- Diferenciação osteoblástica e formação de matriz mineralizada.
- Expressão gênica para *scaffolds* de PHBV.

4 MATERIAL E MÉTODO

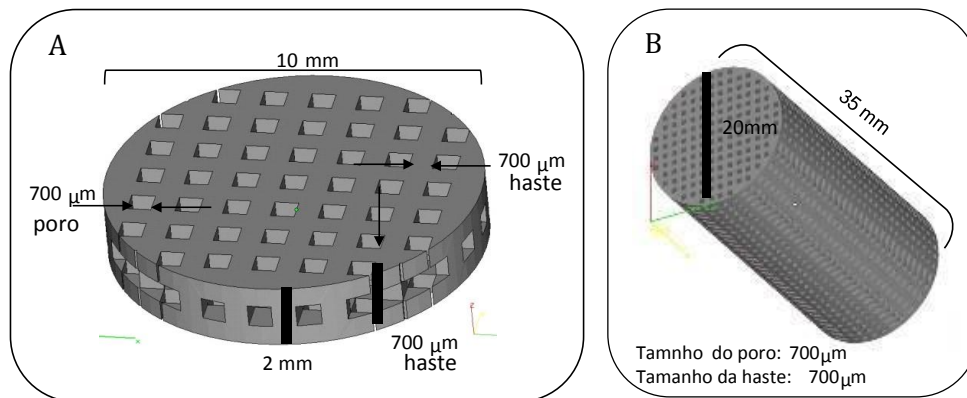
Para a realização dos estudos incluídos nesta dissertação foram utilizados *scaffolds* à base de PHB funcionalizados com celulose bacteriana associados ou não a fosfatos de cálcio (hidroxiapatita [HA]) e peptídeo osteogênico (Estudo 1), e *scaffolds* à base de PHBV associados ou não a fosfatos de cálcio (apatita [OAP]) (Estudo 2). Após a impressão dos *scaffolds* em modelos 3D foi feita a divisão dos grupos em: PHB (sem modificações); PHB-CB (PHB revestido com CB); PHB-CB-OGP (PHB revestido com CB e incorporação de OGP); PHB-CB-HA-OGP (PHB revestido com CB e incorporação de HA e OGP); PHBV (sem modificações); PHBV-La₂₀OAP (PHBV com incorporação de 20% de Lantânio à oxiapatita).

Obtenção das Amostras

Confeção dos Scaffolds de PHB

Os modelos 3D foram confeccionados utilizando o equipamento *SinterStation 2000 (DTM Corporation)* no Centro de Tecnologia da Informação – Renato Archer- CTI (Campinas- SP, Brasil) pelo método *Selective Laser Sintering (SLS)*. Primeiramente foram gerados modelos geométricos virtuais por meio do programa *SolidWorks CAD 3D (Dassault Systèmes SolidWorks Corp. França)*. No processo de fabricação dos *scaffolds*, o PHB (Biocycle[®], PHB Industrial S/A., Serrana-SP, Brasil) foi utilizado com tamanho de partículas entre 10-100 µm e o equipamento de *SLS* com laser de CO₂. Os *scaffolds* foram produzidos nas dimensões de 10 mm de diâmetro, 2 mm de espessura e poros de 700 µm (Figura 2A). Para os corpos de provas dos ensaios de resistência mecânica, os *scaffolds* foram confeccionados nas dimensões de 35 × 20 mm, com poros de 700 µm (Figura 2B).

Figura 2- Modelos virtuais 3D dos scaffolds de PHB. A= Modelo de 10mm x 2mm; B= Modelo de 20mm x 35mm.



Fonte Elaboração própria.

Após a confecção das amostras por manufatura aditiva as mesmas foram limpas com jato de nitrogênio para remoção dos grânulos de PHB não sinterizados remanescentes no interior dos poros.

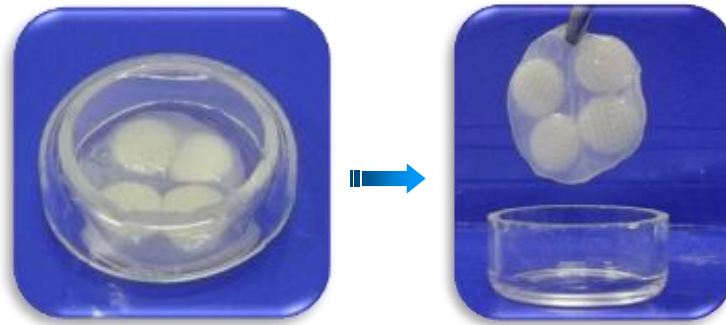
As etapas seguintes de incorporação de CB, CB-HA ou do peptídeo OGP foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química da UNESP, Araraquara- SP, sob a orientação da pesquisadora Dra. Sybele Saska Specian.

Revestimento dos scaffolds de PHB com CB

O revestimento dos *scaffolds* impressos a partir da Prototipagem Rápida com CB foi realizado por meio do cultivo líquido da bactéria *Gluconacetobacter xylinus* (ATCC 23760) por meio de crescimento estático (sem agitação)¹⁶.

As culturas de CB crescidas nas peças 3D (10 × 2 mm) foram otimizadas em placas de Petri de 25 mm de diâmetro, contendo 4 *scaffolds* por placa (Figura 3). A linhagem *G. xylinus* foi cultivada em 2 ml de meio com 10% (v/v) de inóculo nas respectivas placas contendo os *scaffolds* e, após 24 horas de cultivo os *scaffolds* foram invertidos e mais 1 mL de meio de cultura foi adicionado a cada placa permanecendo por mais 24 horas, totalizando 48 horas.

Figura 3- Crescimento da CB em peças 3D de PHB, 10×2 mm, sem agitação.



Fonte Elaboração própria.

A purificação da CB nos *scaffolds* foi realizada em solução de hidróxido de sódio a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ por 30 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente lavou-se os mesmos exaustivamente com água destilada e o armazenamento foi feito em água ultrapura.

Revestimento dos scaffolds com o compósito de celulose bacteriana – hidroxiapatita (CB-HA)

Para a adsorção da apatita (fosfatos de cálcio) aos *scaffolds* de PHB revestidos com CB ⁶², as peças 3D revestidas com CB foram imersas em etanol 20%, à temperatura ambiente (TA) por 24 h. As apatitas foram precipitadas na CB pela realização de ciclos de incubação alternados, inicialmente imersão em solução de CaCl_2 $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e após 24 h a TA os *scaffolds* foram imersos em solução de Na_2HPO_4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente, os *scaffolds* foram secos em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ para obtenção do *scaffolds* revestidos com o compósito CB-HA.

Incorporação do peptídeo OGP nas amostras

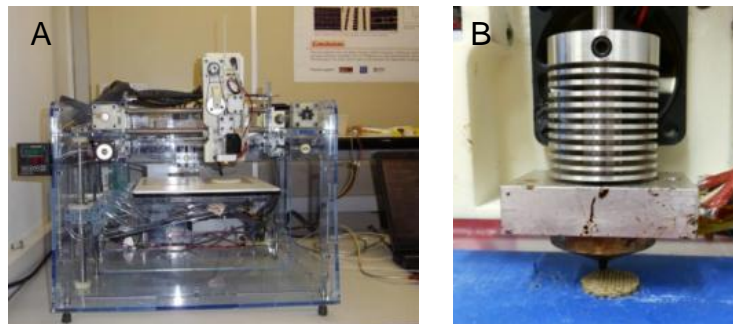
O peptídeo OGP foi sintetizado a partir da metodologia de síntese em fase sólida, pela Empresa *AminoTech* (Diadema- SP, Brasil).

Para incorporação do peptídeo às amostras de PHB-CB foi realizado o processo de adsorção. A concentração utilizada foi de $10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, preestabelecida em estudos *in vitro* realizados anteriormente ⁶³. Em estudo prévio do grupo observou-se que a liberação do peptídeo OGP em membrana de CB foi obtida em 10 horas, assumindo o perfil de liberação gradual ⁶³.

Confecção dos scaffolds de PHBV

As amostras foram confeccionadas empregando a tecnologia de impressão 3D por extrusão de filamento *Fab@CTI*- CTI (Campinas- SP, Brasil) como observado na Figura 4, utilizando uma plataforma experimental *open source* baseado no equipamento *Fab@Home* ^{45, 64}. Os biomodelos físicos 3D foram gerados utilizando como matéria-prima as amostras PHBV e PHBV-La₂₀OAP previamente extrudadas na forma de filamento de aproximadamente 3 mm de diâmetro (Figura 4A e B). O modelo geométrico virtual foi desenhado com poros regulares e interconectados (0°/90°) na seguintes dimensões: 13 mm de diâmetro, 1,75 mm de espessura, distância entre as colunas de 0,5 mm e altura de camada de 0,35 mm. Constituindo um modelo de 5 camadas.

Figura 4- Impressora Fab@CTI; B: Processo de confecção dos *scaffolds* de PHBV-La₂₀OAP por extrusão de filamentos.



Fonte Elaboração própria.

Síntese da apatita dopada com lantânio - La₂₀OAP

A apatita dopada com 20% de La foi sintetizada a partir de uma mistura estequiométrica composta de CaCO₃ (51,4%, m/m), La₂O₃ (14,4%, m/m) e (NH₄)HPO₄ (34,2%, m/m), por meio de reação de estado sólido em alta temperatura ²⁶.

Preparação das amostras PHBV e do compósito PHBV-La₂₀OAP

O polímero utilizado para a preparação dos filamentos foi o PHBV com 3 a 4% de valerato fornecido pela *Biocycle*[®] (PHB Industrial S/A, Serrana- SP, Brasil). As amostras foram sintetizadas pelo método de extrusão utilizando uma extrusora com dupla rosca, obtendo-se filamentos com diâmetro médio entre 3 a 3,2 mm. (*B&P*

Process Equipment and Systems - APV Baker Ltd, Austrália), em colaboração com a profa. Dra. Alessandra de Almeida Lucas do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos- UFSCar. Adicionalmente, o método de impressão das matrizes por Extrusão de Filamentos associado à incorporação de La ao PHBV, permitiu a confecção de *scaffolds* com radiopacidade satisfatória, permitindo a distinção de tecido mineralizado e não mineralizado (Figura 5).

Figura 5- Imagem radiográfica do scaffolds de PHBV-La₂₀Oap.



Fonte Elaboração própria.

Esterilização das amostras

As amostras para os ensaios *in vitro* pertencentes ao Estudo 1 foram secas, acondicionadas em envelopes apropriados e esterilizadas por radiação gama a 20 KGy pela EMBRARAD (Cotia- SP, Brasil). As peças do Estudo 2 foram esterilizadas em álcool 70% por 3 horas, posteriormente secas, mantidas em meio de cultura celular α -MEM com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (P/S), em incubadoras de CO₂ a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico até o momento da semeadura celular sobre os *scaffolds*.

Caracterização Morfológica e Físico-química

Microscopia eletrônica de varredura- Energia dispersiva de raios-x (MEV/EDS)

Para avaliação das características da superfície dos materiais foram realizados ensaios de MEV e EDS para determinação das fases inorgânicas adicionadas aos materiais. As amostras do Estudo 1 foram recobertas com uma camada de ouro com espessura de 10 nm durante 80 segundos, tensão de 3 Kv e corrente de 15 μ A. As micrografias foram realizadas sob tensão de 2 Kv. As micrografias e o EDS foram obtidas em microscópio eletrônico modelo FEG-MEV, JEOL – JEM 1200 realizadas no Laboratório de Microscopia Avançada Multiusuários (Departamento de Química Geral e Inorgânica, do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual de São Paulo).

No Estudo 2 as amostras foram recobertas por uma camada de ouro de espessura de 6 nm (20 s, tensão de 3 Kv e corrente de 15 mA). As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Magellan 400L, com detector da marca EDAX modelo Apolo X no Laboratório de Caracterização Estrutural (Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, SP).

Para as análises por meio de MEV/EDS dos Estudos 1 e 2 foram utilizadas três amostras de cada tipo de *scaffold* em quais eram presentes a fase inorgânica (n= 03). Para cada amostra foi feita a varredura de toda a superfície obtendo-se três fotos em campos distintos. Os *scaffolds* com o peptídeo OGP não foram avaliados, pois a incorporação do mesmo não provoca alterações das características físicas dos materiais.

Análise de resistência mecânica

Para a análise de resistência mecânica dos materiais pertencentes ao Estudo 1 foram feitos testes de resistência à compressão dos *scaffolds* de PHB e PHB-CB, realizadas em uma máquina universal de ensaios mecânicos modelo Instron 5569 no Laboratório de Ensaios Mecânicos do CCDM (Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, SP). Os corpos de prova foram confeccionados segundo as normas da ASTM D1621:10 e F2150:07. A resistência à compressão foi calculada de acordo com a Equação (1).

$$(1) RC = \frac{F}{A}$$

Onde: F: força máxima de carregamento aplicada (Newton);

A: área da secção transversal do corpo de prova antes do ensaio (mm²).

Os ensaios de resistência mecânica foram feitos para as diferentes amostras secas e úmidas. Antes de cada medida, as amostras úmidas foram imersas em solução SBF (*simulated body fluid*: solução de Kokubo) ³⁸ por 30 min a temperatura ambiente, para simular a resistência à compressão do material após implantação cirúrgica. Decorrido os 30 min, o excesso de SBF foi rapidamente removido com papel de filtro e em seguida as amostras foram colocadas nos dispositivos acoplados à máquina de ensaios.

Análise dinâmico-mecânica

Para os materiais pertencentes ao Estudo 2 foram realizados ensaios dinâmico-mecânico para as amostras de PHBV e PHBV-La₂₀OAP, para avaliarmos o comportamento destas matrizes quando aplicadas determinadas tensões, e temperaturas. Os testes foram realizados no equipamento - DMA Q 800 (*TA Instruments*, EUA) a fim de se obter os módulos de armazenamento. Os corpos de prova foram confeccionados com uma geometria retangular com dimensões de 40 x 12 x 3 mm.

Os ensaios foram feitos utilizando-se o modo de flexão em um ponto (*single cantilever*) à temperatura de 37°C e variação de frequência de 0,1 a 10 Hz, e também fixando a frequência em 1 Hz e variando a temperatura de 32°C a 40°C, que corresponde à temperatura corpórea.

Para os testes de resistência mecânica dos materiais foram utilizadas três amostras de cada tipo de *scaffold* (n= 03).

Estudo do comportamento celular in vitro

Para os experimentos in vitro foram utilizadas células primárias mesenquimais derivadas de ossos longos de ratos (*Rat bone marrow stem cell - RBMSC*), obtidas a partir da extração do conteúdo interno da medula óssea da tíbia e do

fêmur bilateral ⁴⁶ (Processo 32/2014 aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animal, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP) (Anexo).

Para a extração das células foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus holtzman*, com 15 a 21 dias, com peso inicial de aproximadamente 50 gramas. Após anestesia com Ketamina (0,08 mL/ 100 g) e Xilazina (0,04 mL/ 100 g), os animais foram sacrificados por aprofundamento anestésico. Inicialmente foi feita a dissecação do fêmur e da tíbia bilateral, cortando-se as epífises e realizando a lavagem da parte medular dos ossos com meio de cultura celular α -MEM com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina (P/S). O conteúdo da medula óssea foi centrifugado a 300 g por 5 min em temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em 10 mL de α MEM com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina para cada osso longo, semeadas em placas de cultura de 100 mm e cultivadas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após 24 h foi feita a troca do meio de cultura para remoção das células não aderidas. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias, até uma expansão celular com uma confluência em torno de 80%. Neste estágio as células foram congeladas em FBS com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para as análises *in vitro*, as células foram plaqueadas na terceira passagem com densidade celular de 2×10^5 sobre placas de cultura celular e *scaffolds* de PHB, PHB-CB, PHB-CB-OGP, PHB(CB-HA)-OGP, PHBV e PHBV-La₂₀OAP em placas para cultura celular de 24 poços. Para a realização dos experimentos do Estudo 1 com os *scaffolds* de PHB, PHB-CB, PHB-CB-OGP, PHB-(CB-HA)-OGP houve a necessidade de fixação das amostras ao fundo da placa com vaselina sólida estéril antes do plaqueamento. As células foram semeadas em 50 μ L de meio de cultura sobre os *scaffolds* e após 2 h esse volume foi completado para 1 mL/poço. O cultivo foi feito em meio α -MEM suplementado com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerofosfato, para estímulo da diferenciação osteoblástica, a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

As respostas celulares foram analisadas por meio de morfologia celular através de MEV; viabilidade e proliferação celular utilizando o Kit *Alamar Blue*[®] (*Molecular Probes, EUA*); formação de nódulos minerais pelas células cultivadas em placa de cultura celular a partir do método de coloração com Vermelho de Alizarina –

Alizarin Red S (Sigma-Aldrich[®], EUA). Para os Estudos 1 e 2 a análise da formação dos nódulos minerais foi complementada por meio da medida da absorvância do corante associado ao cloreto de cetilpiridínio a 10% em PBS, e a expressão gênica de proteínas associadas aos estágios de diferenciação e atividade osteoblástica das células foi avaliada por PCR em tempo real.

Morfologia celular

Nos Estudos 1 e 2 a morfologia e o estágio de espraiamento celular foram avaliados por meio da MEV, sendo que para as amostras do Estudo 1 foram feitas análises de superfície com períodos de 1, 3 e 7 dias, e corte transversal com período intermediário de 3 dias, já para as amostras do Estudo 2 foram feitas análises de superfície com períodos de 1, 3 e 7 dias.

As amostras analisadas em corte transversal foram as mesmas que utilizadas para as análises de superfície, porém os scaffolds eram divididos ao meio e posicionados com a face interna voltada para o detector do aparelho.

Para identificarmos a afinidade das células com os materiais, utilizamos *scores* de 1 a 4, para representarem a morfologia celular⁶¹. O *score* 1 indica células com formato arredondado, o *score* 2 é utilizado para as células arredondadas com prolongamentos citoplasmáticos, o *score* 3 indica células com início de espraiamento do citoplasma e emissão de filopódias, e por fim no *score* 4 as células se encontram com o máximo de espraiamento (achatadas) e com emissão de várias filopódias.

Para os Estudos 1 e 2 foram utilizadas três amostras de cada tipo de *scaffold* (n= 03) em diferentes experimentos. Para cada amostra foi feita a varredura de toda a superfície obtendo-se três fotos em campos distintos, e para cada grupo foi classificado o *score* de cada imagem.

As amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2 % (Sigma-Aldrich[®], EUA) em α -MEM puro (Gibco[®]) e glutaraldeído a 2% (Sigma[®]) em tampão cacodilato 0,1 mol.L⁻¹ (Sigma[®]), lavadas em solução tampão fosfato (PBS), desidratadas em concentrações crescentes de álcool etílico, cortadas ao meio, secas e mantidas em dissecador a vácuo até o momento da análise da superfície e seção transversal. Posteriormente foram recobertas com uma camada de 6 nm de ouro. As amostras do Estudo 1 foram analisadas no microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Magellan 400L, com detector da marca EDAX modelo Apolo X no Laboratório de Caracterização

Estrutural (Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, SP). As amostras do Estudo 2 foram analisadas no microscópio eletrônico da marca *Topcon*, modelo SM 300 no Laboratório de Microscopia Eletrônica Multiusuários (Departamento de Química Geral e Inorgânica, do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista).

Análise da Viabilidade e proliferação celular

A proliferação e a viabilidade celular dos Estudo 1 e 2, foram avaliadas após 3, 6, 9, 15, 18 e 21 dias de incubação com densidade celular de utilizando o teste *Alamar Blue*[®] (*Molecular Probes*, EUA). Neste ensaio ocorre uma reação de redução no interior das mitocôndrias celulares de células viáveis, que converte o produto resazurina (coloração azul) para sua forma reduzida resofurina (coloração rósea). Este composto reduzido é transportado para fora das células onde se consegue quantificá-lo espectrofotometricamente no sobrenadante. Os *scaffolds* foram incubados em uma placa de 24 poços, contendo 1 mL de meio (α -MEM suplementado com 10% de FBS, 1% de P/S, 50 μ g/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato e 10% de *Alamar Blue*[®]. Após o tempo de incubação de 4 horas, alíquotas de 150 μ L foram coletadas de cada amostra e transferidas para uma placa de 96 poços para a leitura em um espectrofotômetro em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O número de células viáveis está relacionado com o nível de redução de corante, cuja viabilidade é expressa em percentual de redução de acordo com o protocolo do fabricante. Sendo assim, para a análise dos resultados foi calculado a diferença do percentual de redução comparando os grupos testes com o grupo controle positivo (C+ = células cultivadas no plástico da placa de cultura).

Este ensaio foi realizado em triplicata para cada material com três repetições independentes.

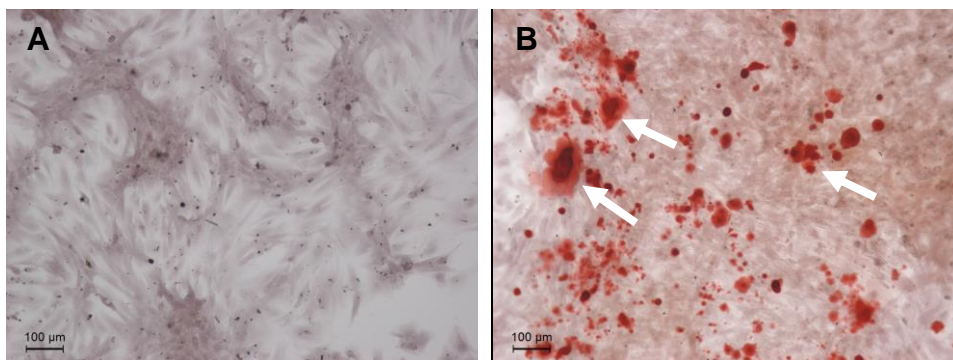
Detecção da formação de nódulos minerais por coloração com Vermelho de Alizarina

Para a avaliação da formação de nódulos de mineralização utilizamos o período de 21 dias das culturas crescidas sobre placas de cultura de 35mm de diâmetro e sobre os *scaffolds* pertencentes aos Estudos 1 e 2.

Foram feitos experimentos distintos, e utilizadas três placas de cultura celular de 35mm de diâmetro (n= 3), sobre as quais foram cultivadas as células *RBMSC* com duas composições do meio de cultura celular (meio de cultura com ou sem indutores de mineralização).

As *RBMSC* cultivadas sobre as placas de cultura celular e *scaffolds* foram lavadas com solução de Hanks, fixadas em álcool etílico a 70% a 4°C por 60 min, e lavadas na sequência de PBS e água destilada. Em seguida, foram coradas com vermelho de Alizarina a 2%, pH 4,2, à TA por 2 min. A padronização do teste para confirmação da diferenciação celular e formação de nódulos minerais foi realizada previamente em um estudo piloto, no qual as células *RBMSC* foram semeadas em placas de cultura celular de 100mm e cultivadas na presença ou não de meio de cultura indutor de diferenciação osteoblástica, por um período de 21 dias (Figura 6).

Figura 6- Análise da formação de nódulos minerais por coloração com Vermelho de Alizarina. A: *RBMSC* com meio para cultura celular sem agentes indutores. B: *RBMSC* com meio para cultura celular com agentes indutores. Aumento de 10x, a seta indica a presença dos nódulos minerais.



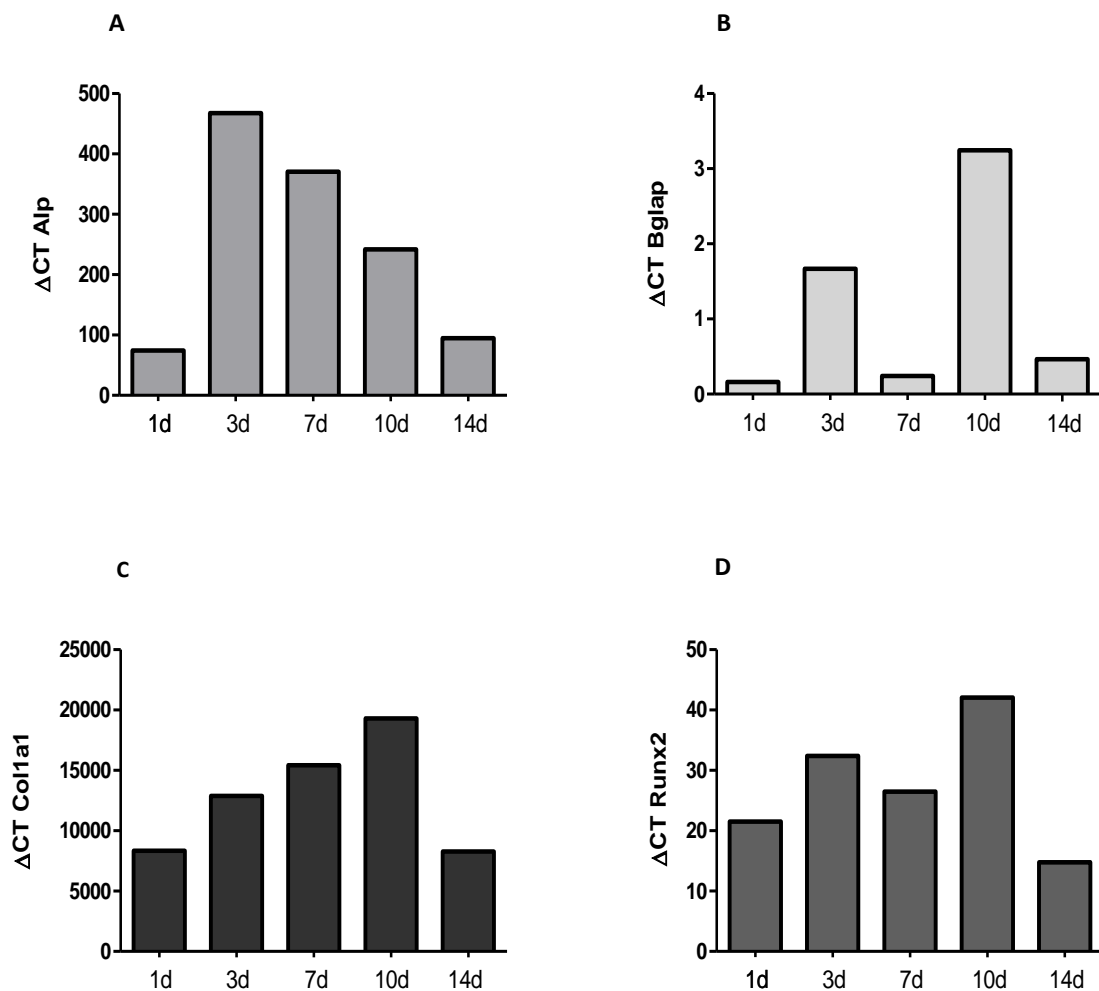
Fonte Elaboração própria.

Para avaliarmos quantitativamente a formação de nódulos minerais, o corante foi diluído com solução de cloreto de cetilpiridínio 10% em PBS. Posteriormente, 150 µl desta solução foi transferida para uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância das amostras foi realizada por um espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm²⁵.

Análise da expressão gênica de proteínas indicadoras de diferenciação osteoblástica.

Como genes codificadores de proteínas indicadoras de diferenciação osteoblástica foram avaliados: Osteocalcina (*Bglap*), Fosfatase alcalina (*Alp*), Colágeno tipo 1 – alfa 1 (*Col1a1*) e *Runx2* (runt-related transcription factor 2), analisadas por meio de PCR-Tempo Real (Step-One Plus, Applied Biosystem, EUA).

Figura 7- Análise de expressão de genes indicadores de diferenciação osteoblástica. A: Fosfatase alcalina (*Alp*), B: Osteocalcina (*Bglap*), C: Colágeno tipo 1- alfa 1 (*Col1a1*) e D: *Runx 2* (*runt-related transcription factor 2*) por meio de PCR-Tempo Real (*Step-One Plus, Applied Biosystem*).



Fonte: Elaboração própria.

As células *RBMSC* foram cultivadas em placas de cultura celular com 24 poços, com meio indutor de mineralização, mantidas em incubadora com 5% de CO₂, a 37°C, durante intervalos de tempo de 1 a 14 dias.

O RNA total das células foi extraído com o Kit *Rnaqueos 4PCR Mini Kit* (*Ambion*, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, o cDNA foi obtido por meio do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystem*, EUA), seguindo as orientações do fabricante, e as condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e os ciclos de 95° C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. As expressões gênicas dos genes alvo foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo *Gapdh*. A reação de PCR em Tempo Real foi realizada pelo sistema *TaqMan* utilizando *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystem*, EUA) e os ensaios inventoriados; *Alp* (fosfatase alcalina) - Rn 01516028-m1; *Bglap* (osteocalcina) –Rn 00566386-g1; *Coll1a1* (colágeno tipo 1- alfa 1) –Rn 01463848-m1; *Runx2* (runt-related transcription factor 2) – Rn 01512298-m1.

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstram que o período de 10 dias apresentou maior expressão dos genes avaliados, exceto a fosfatase alcalina (por ser um marcador da fase inicial da diferenciação). Portanto, o período de 10 dias foi escolhido para a realização dos experimentos com os *scaffolds*, sendo o mesmo realizado em unicata de cada tipo de material, em um mesmo ensaio.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 6.01. Após confirmação da normalidade dos dados, para a análise do teste Alamar Blue foi utilizado o teste ANOVA Two-Way complementado pelo teste de Tukey. Para as demais análises foi utilizado o teste não paramétrico. Para comparações de três ou mais grupos foram utilizados os testes de Kruskal- Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Foi considerado um nível de significância de 5% para todos os testes.

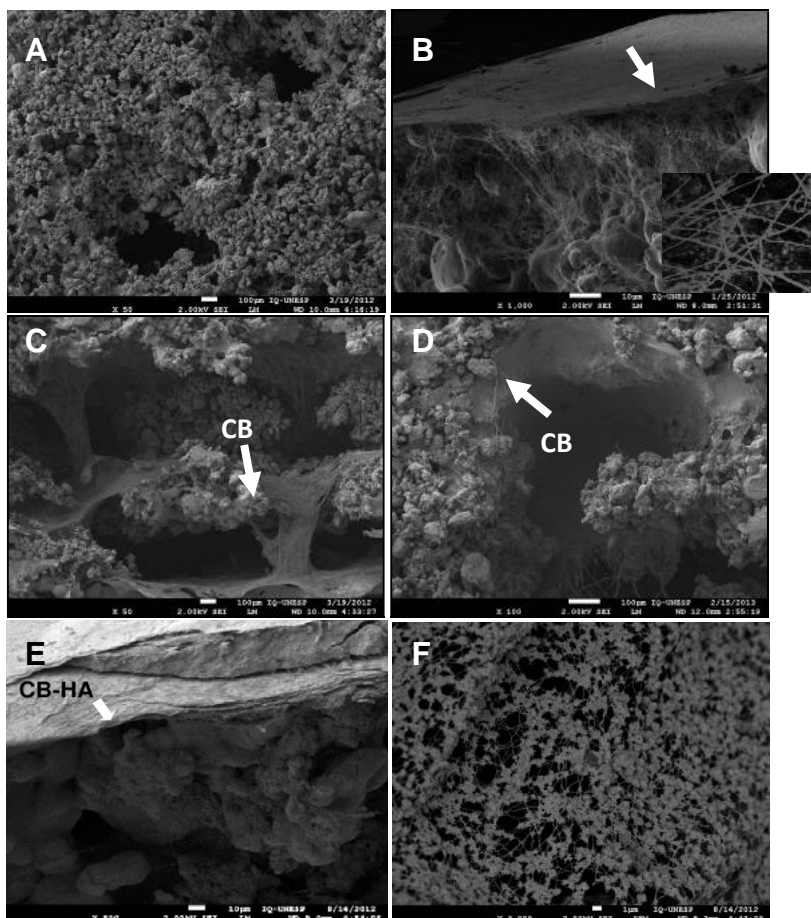
5 RESULTADO

PHB revestido com CB/ CB-HA, funcionalizado ou não com OGP (Estudo 1)

Caracterização Morfológica e Físico-Química

A Figura 8 mostra as micrografias dos *scaffolds* de PHB, e PHB funcionalizado com CB (mantidos em cultura bacteriana por períodos de 48 horas), e CB-HA com posterior precipitação de apatita à CB.

Figura 8- Micrografias obtidas por MEV, do *scaffold* de PHB, PHB-CB e PHB-CB-HA. A: superfície do *scaffold* de PHB (50×); B-C: membrana de CB revestindo toda superfície do *scaffold* de forma homogênea formando nanofibrilas de CB e interconectando com os demais poros das camadas abaixo (1000× e 50×; seção transversal). D: CB preenchendo os poros do *scaffold* (100×). E: membrana de CB-HA revestindo toda a superfície do *scaffold* (500×; seção transversal). F: deposição de cristais de HA em nanofibrilas de CB. As setas indicam as camadas de celulose bacteriana (3000×; seção transversal).

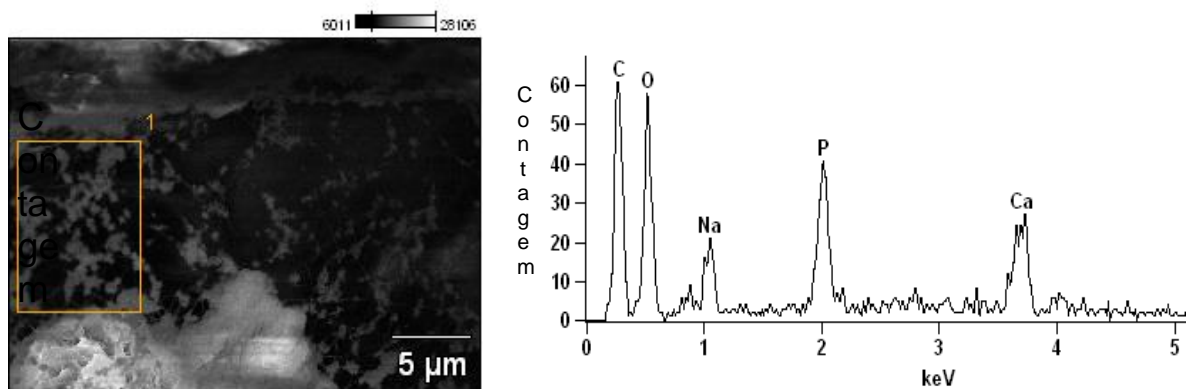


Fonte Elaboração própria.

A imagem de MEV feita da superfície dos *scaffolds* de PHB (Figura 8A) nos mostra a porosidade intrínseca do material e o tamanho dos poros de aproximadamente 700 μm de diâmetro, produzidos durante o processo de confecção dos *scaffolds* a partir da técnica de impressão SLS. Observando os *scaffolds* de PHB revestidos com a CB ou CB-HA, verificamos que a CB apresenta-se como um agregado de cadeias de celulose em uma estrutura ultrafina formada por nanofibras longas e contínuas, sendo capaz de preencher alguns poros dos *scaffolds* por completo (Figura 8D), além de ser depositada por toda estrutura tanto na superfície (Figura 8B e E) quanto na estrutura interna (Figura 8C).

A Figura 9 nos mostra o resultado da análise feita por meio do *EDS* para as amostras de PHB(CB-HA).

Figura 9- Espectro de EDS para amostra PHB/CB-HA (Ca/P = 1,35).



Fonte Elaboração própria.

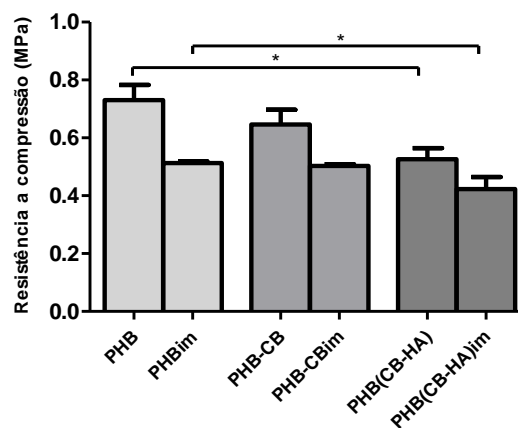
Nos *scaffolds* de PHB com CB-HA as razões molares Ca/P encontradas foram entre 1,00 a 1,35 como observado no gráfico da Figura 9. A razão molar Ca/P = 1,00, pode estar relacionada às várias fases de apatita, sendo elas: fosfato dicálcio (monetita) – DCP: CaHPO_4 , fosfato dicálcio dihidratado (brushita) – DCPD: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou pirofosfato de cálcio – CPP: $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ Com relação à razão molar Ca/P = 1,35 pode ser atribuída ao fosfato octacálcio (OCP): $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, cujo valor teórico é 1,33, ou ainda a uma fase de fosfato tricálcio, cujo valor teórico é 1,40. Portanto, sugere-se que a metodologia empregada para precipitação *in situ* da fase inorgânica favoreceu a incorporação de mais de uma fase de fosfato de cálcio ao *scaffold*.

Análise de resistência mecânica

Para esta análise foram feitos testes de resistência à compressão dos *scaffolds* de PHB revestidos com CB/CB-HA funcionalizados ou não com OGP, secos e úmidos (mantidos em solução de SBF para simular o momento o início das etapas cirúrgicas).

Os valores obtidos a partir dos ensaios de resistência mecânica dos *scaffolds* de foram em média de $0,73 \pm 0,05$ para o PHB, $0,65 \pm 0,05$ para PHB-CB⁵³, e $0,57 \pm 0,05$ para PHB(CB-HA). Desta forma podemos inferir que o revestimento dos *scaffolds* de PHB com a CB promoveu uma redução em torno de 11% da resistência à compressão dos *scaffolds* de PHB-CB, e o revestimento *scaffolds* de PHB com CB-HA promoveu uma redução em torno de 28% quando secos. Porém quando úmidos não observamos diferença entre as resistências mecânicas entre os *scaffolds* de PHB e PHB-CB. Entretanto as amostras de PHB(CB-HA) apresentam uma redução de 20% em relação ao PHB quando úmidos. A resistência da amostra PHB seca para PHB úmida reduz em 29%. Dentre as diferenças observadas, apenas apresentou significância estatística a redução na resistência à compressão dos *scaffolds* de PHB(CB-HA) seco, quando comparado ao PHB seco, e PHB(CB-HA) úmido comparado ao PHB úmido (Figura 10).

Figura 10- Resistência à compressão dos *scaffolds* obtida sob diferentes condições. Amostras secas: PHB, PHB-CB, PHB(CB-HA). Amostras úmidas em solução SBF: PHBim, PHB-CBim, PHB(CB-HA)im, ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis/ Dunn).



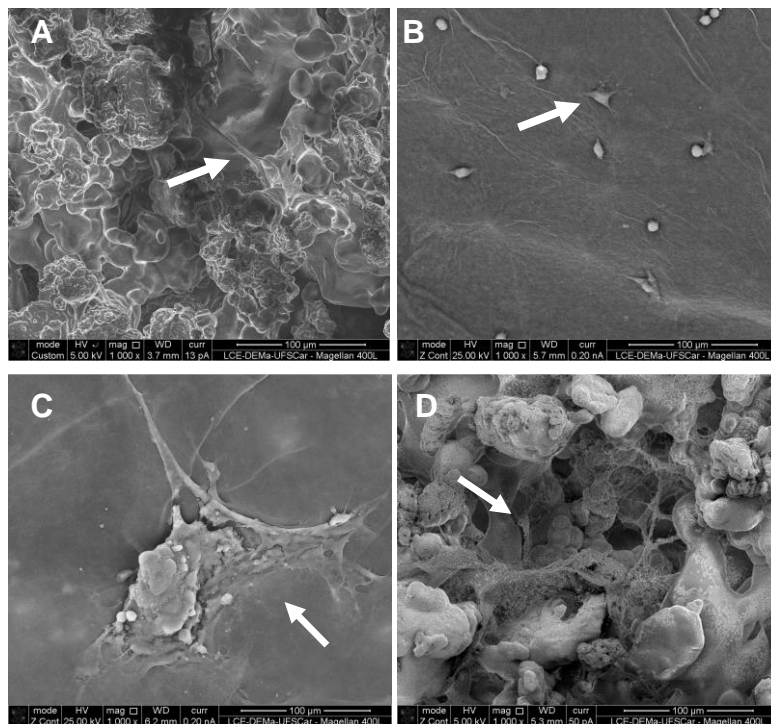
Fonte Elaboração própria.

Análises de comportamento celular *in vitro*

Microscopia eletrônica de varredura/ (MEV)

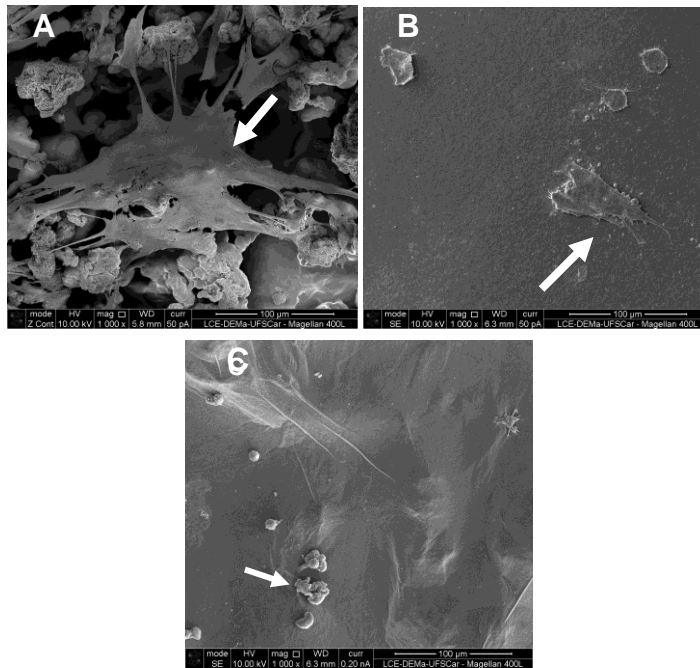
A morfologia e o espraioamento celular referentes aos períodos de 1, 3 e 7 dias de cultura analisados por MEV estão demonstrados nas Figuras de 11 a 14.

Figura 11- Imagens de MEV, aumento de 1000x, micrografias da superfície com 1 dia de cultivo celular. A: PHB; B: PHB-CB; C: PHB-CB-OGP; D: PHB(CB-HA)-OGP. As setas das Figuras C e D indicam espraioamento celular *score 3*, a seta da Figura A indica a emissão de filopódias pela célula, *score 3* a seta da Figura B indica a célula em *score 2* de espraioamento celular.



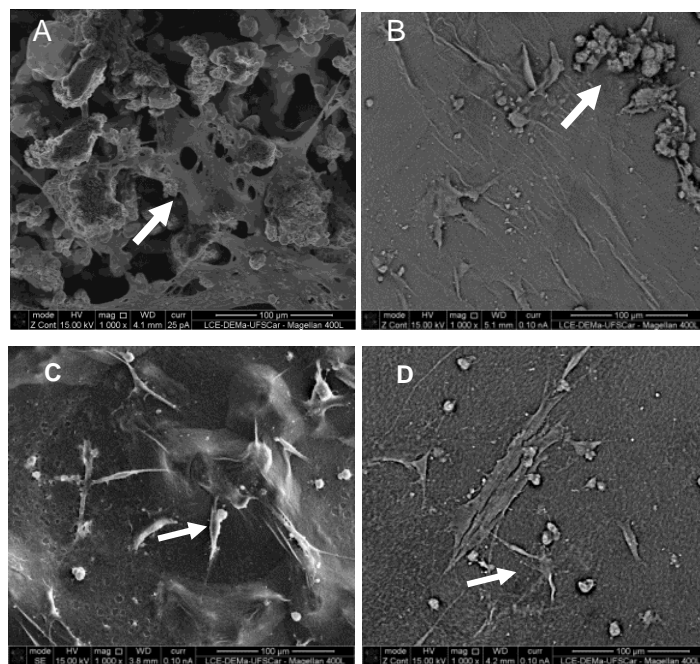
Fonte Elaboração própria.

Figura 12- Imagens de MEV, aumento de 1000x, micrografias da superfície com 3 dias de cultivo celular. A: PHB; B: PHB-CB; C: PHB-CB-OGP. A seta da Figura A indica o espraioamento celular em *score* 4, a seta da Figura B indica *score* 3 e C espraioamento *score* 1.



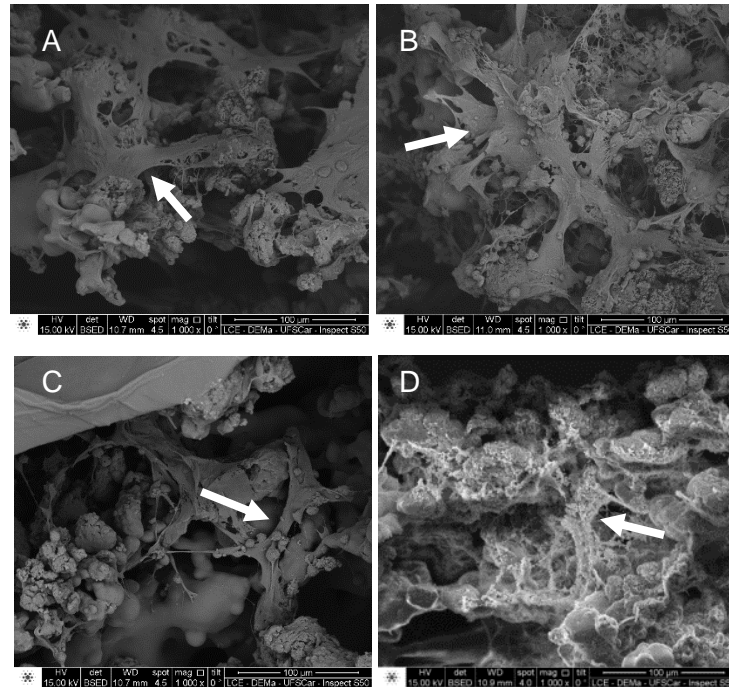
Fonte Elaboração própria.

Figura 13- Imagens de MEV, aumento de 1000x, micrografias da superfície com 7 dias de cultivo celular. A: PHB; B: PHB-CB; C: PHB-CB-OGP; D: PHB(CB-HA)-OGP. A seta da Figura A indica espraioamento *score* 4, C indicam o espraioamento *score* 3, e B e D indicando *score* 1.



Fonte Elaboração própria.

Figura 14- Imagens de MEV, aumento de 1000x, micrografias de corte transversal com 3 dias de cultivo celular. A: PHB; B: PHB-CB; C: PHB-CB-OGP; D: PHB(CB-HA)-OGP. As setas das Figuras A, B e C indicam o espraioamento celular *score* 4, a seta da Figura D indica a emissão de filopódias pela célula em *score* 3.



Fonte Elaboração própria.

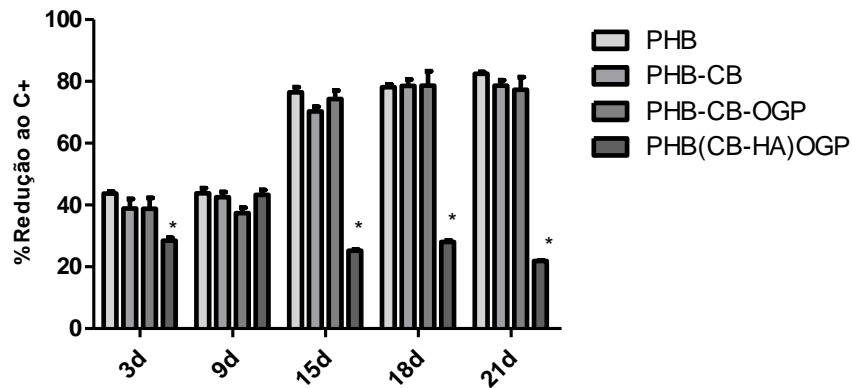
As imagens de MEV nos mostram que o PHB permitiu a adesão celular e a ocorrência do espraioamento do citoplasma com emissão de filopódias (prolongamentos celulares), demonstrando uma íntima relação entre células e materiais. Não foram observadas diferenças significativas entre os *scaffolds* de PHB com diferentes revestimentos das superfícies por meio da análise por microscopia.

Embora aos 7 dias as amostras revestidas com CB e (CB-HA)-OGP mostram um atraso no espraioamento celular na superfície dos *scaffolds* comparado aos demais grupos; nota-se um espraioamento adiantado no interior de todos os *scaffolds* já aos 3 dias, sugerindo que a estruturação tridimensional dos mesmos auxiliou a proliferação celular no seu interior.

Proliferação e Viabilidade Celular

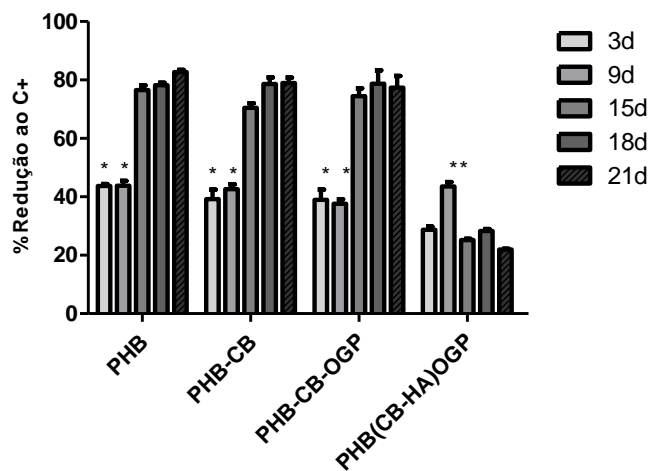
Analisando as figuras 15 A e 15 B podemos observar a proliferação e viabilidade celular nos diferentes *scaffolds*, nos períodos de 3 a 21 dias de cultura.

Figura 15 A- Diferença no percentual de redução do reagente resazurina nos grupos com *scaffolds* em relação ao grupo controle, determinado pelo teste Alamar Blue®, em diferentes períodos. (C+ = células cultivadas no poliestireno). **Análise intergrupos**, * diferente dos demais grupos no mesmo período, ($p < 0,05$ -Two Way ANOVA/Tukey).



Fonte Elaboração própria.

Figura 15 B- Diferença no percentual de redução do reagente resazurina nos grupos com *scaffolds* em relação ao grupo controle, determinado pelo teste Alamar Blue®, em diferentes períodos. (C+ = células cultivadas no poliestireno). **Análise intragrupo**. *diferente dos períodos 15, 18 e 21 dias no mesmo grupo ** diferente dos demais períodos no mesmo grupo ($p < 0,05$ -Two Way ANOVA/ Tukey).



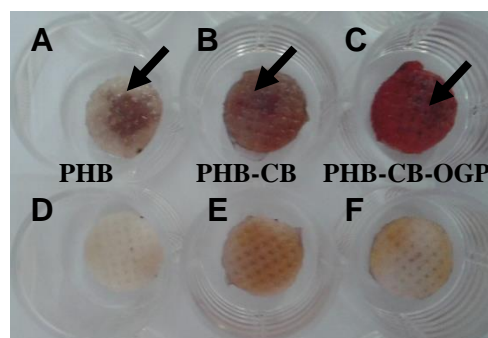
Fonte Elaboração própria.

Nos períodos avaliados, os diferentes *scaffolds* apresentaram uma menor redução do reagente resazurina quando comparado às células cultivadas no plástico, sugerindo um atraso na proliferação celular, principalmente nos primeiros 9 dias. A avaliação intergrupos demonstrou que os *scaffolds* PHB(CB-HA)-OGP apresentaram diferença significativa com relação aos demais, sugerindo um atraso maior na proliferação celular quando semeadas sobre este material. O PHB revestido com a CB, funcionalizado ou não pelo OGP permitiu que as células se mantivessem viáveis e apresentassem um pico de proliferação entre 9-15 dias.

Formação de matriz extracelular mineralizada

A detecção de nódulos minerais formados nos *scaffolds* foi realizada após 21 dias do plaqueamento do experimento, por meio do método de coloração por Vermelho de Alizarina.

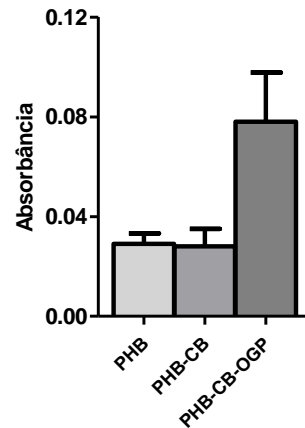
Figura 16- Coloração pelo Vermelho de Alizarina. *Scaffolds* com células: A-C; *scaffolds* sem células: D-F (controle negativo).



Fonte Elaboração própria.

A Figura 16 (A-C) demonstra a formação de nódulos minerais sobre os *scaffolds* de PHB, PHB-CB, PHB-CB-OGP. Os *scaffolds* sem células (controles negativos, Figura 16D-F) apresentaram mínima retenção do corante comparados aos *scaffolds* com células. Os *scaffolds* do grupo PHB(CB-HA)-OGP não foram incluídos neste experimento devido à presença de apatita nos *scaffolds* que podem incorporar o corante e mascarar a identificação dos nódulos.

Figura 17- Análise quantitativa pela absorvância da formação de nódulos minerais pelas células cultivadas por 21 dias sobre os scaffolds de PHB, PHB-CB e PHB-CB-OGP ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis/ Dunn).



Fonte Elaboração própria.

Os resultados obtidos (Figura 17) da absorvância do corante diluído em solução de cloreto de cetilpiridínio 10% em PBS, após a normalização das amostras com os controles negativos (*scaffolds* sem células), demonstram que não houve diferença estatística entre os tipos de *scaffolds*, entretanto nota-se uma tendência dos scaffolds com OGP permitirem uma maior formação de nódulos minerais quando comparado aos outros grupos.

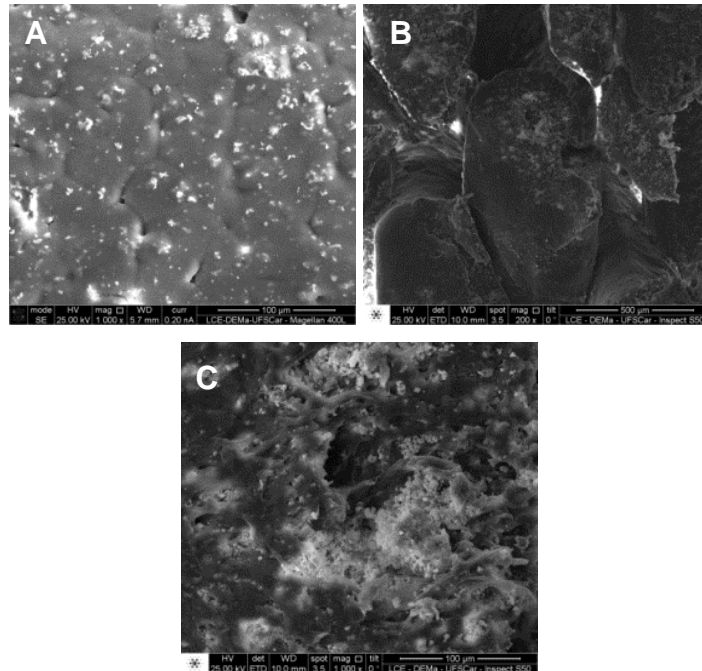
PHBV e PHBV-La₂₀OAP (Estudo 2)

Caracterização Morfológica e Físico-Química

Microscopia eletrônica de varredura/ (MEV)

As micrografias das amostras foram realizadas para avaliação das características de superfície e verificação da estrutura dos *scaffolds*.

Figura 18- Imagens de MEV do *scaffold* PHBV-La₂₀OAP (A: superfície; B e C: seção transversal).

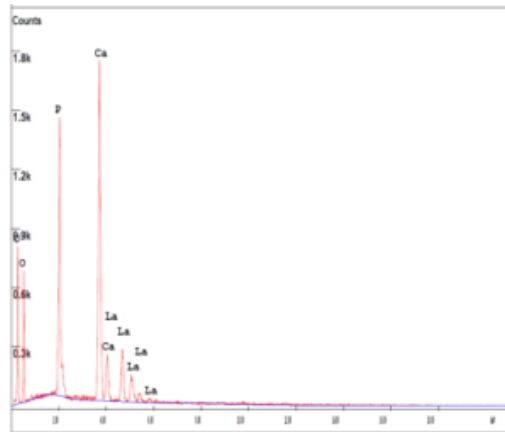


Fonte Elaboração própria.

A Figura 18A mostra a imagem de MEV da superfície do *scaffold* PHBV-La₂₀OAP, a qual revela uma certa rugosidade e presença de algumas microporosidades entre a junção das partículas de PHBV fundidas. Em seção transversal (Figura 18B-C) observa-se a íntima relação entre as camadas impressas do *scaffold* formando uma macroporosidade desejável para os experimentos de cultura celular.

Os elementos constituintes da amostra de PHBV-La₂₀Oap foram identificados por meio da energia dispersiva (EDS), demonstrando a presença das partículas de oxiapatita dopada com lântanio (La₂₀Oap), adicionadas previamente ao polímero PHBV (Figura 19).

Figura 19- EDS realizado para amostra de PHBV-La20OAP.

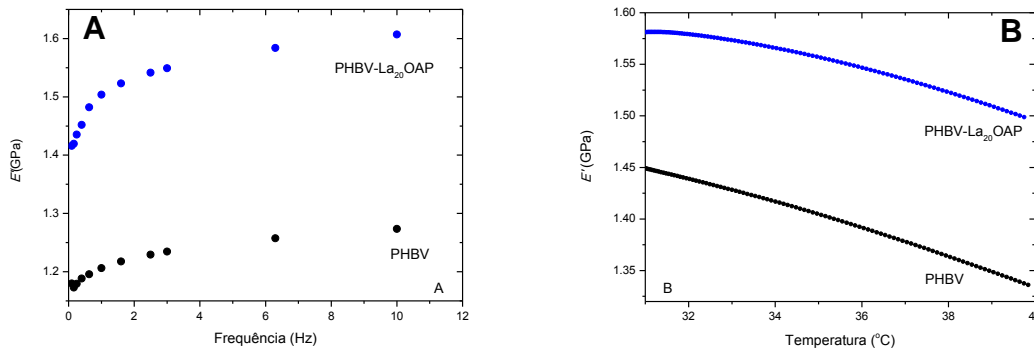


Fonte Elaboração própria.

Análise dinâmico-mecânica

A Figura 20 mostra que os valores do módulo de armazenamento (E') para o compósito PHBV-La₂₀OAP foram superiores comparado ao PHBV.

Figura 20- Módulo de armazenamento para as amostras PHBV e PHBV-La₂₀OAP. A: E' variando a frequência a temperatura ambiente; B: E' variando a temperatura na faixa de 32 a 40 °C com a frequência em 1Hz.



Fonte Elaboração própria.

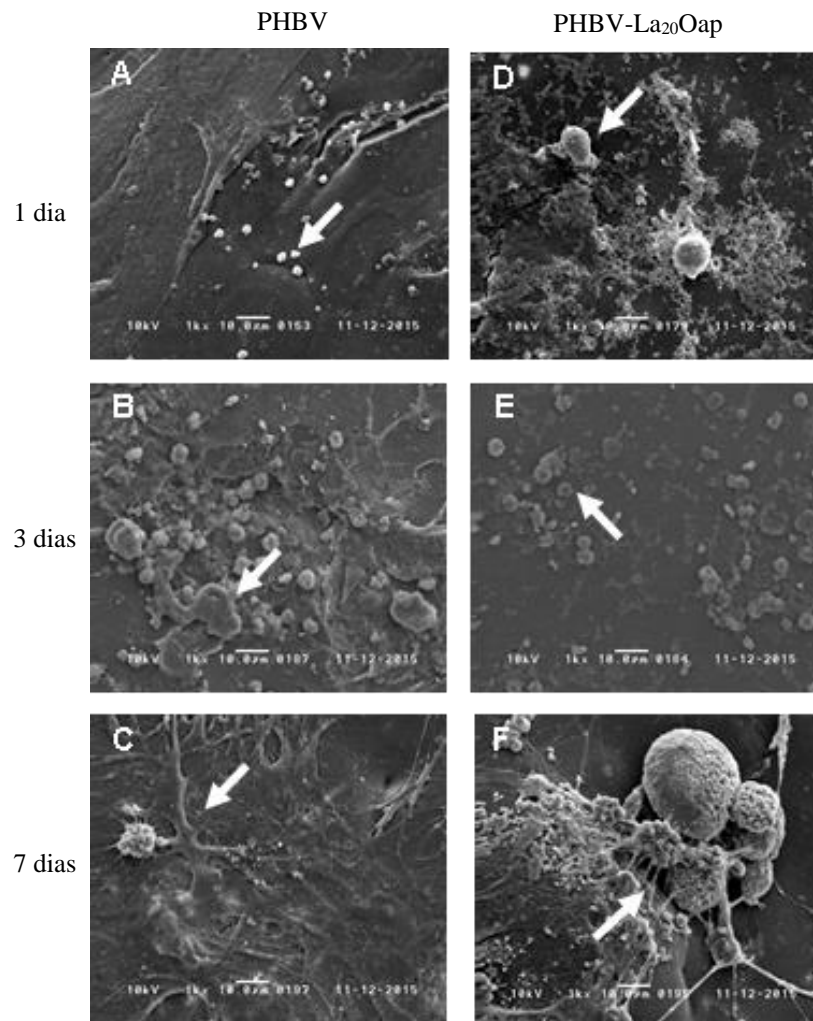
Os valores mensurados para o módulo de armazenamento (módulo elástico) foram superiores para o compósito PHBV-La₂₀Oap em relação ao PHBV, tanto quando se fixou a temperatura (ambiente) e variou a frequência, quanto quando se variou a temperatura em frequência fixa de 1 Hz. Estes dados mostram que a incorporação da fase inorgânica, La₂₀Oap, ao polímero PHBV melhora as propriedades mecânicas do

material, sendo superior mesmo com a variação de temperatura na faixa de temperatura corporal.

Análises de comportamento celular in vitro

Microscopia eletrônica de varredura/ (MEV)

Figura 21- Imagens de MEV, aumento de 1000x, micrografias da superfície do PHBV de A-C, e PHBV-La₂₀Oap de D-F. A e D: 1dia; B e E: 3dias; C e F: 7dias. As setas das figuras A, B, D e E indicam as células com *score* 1 de espraiamento, as setas das figuras C e F indicam o espraiamento celular em *score* 4.



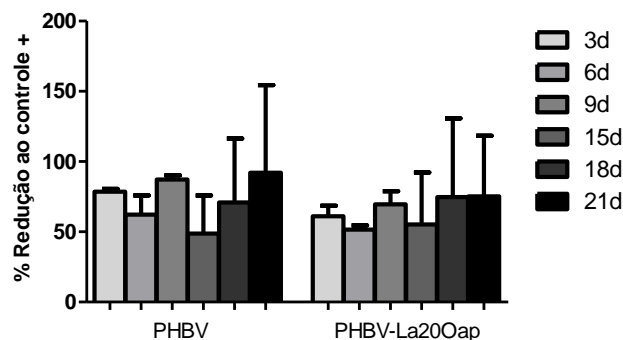
Fonte Elaboração própria.

As imagens da MEV apresentadas na Figura 21 evidenciam a afinidade das células pelos materiais, uma vez que foram capazes de se aderirem ao material e se desenvolverem. Aos 7 dias já é possível observar a diferença da morfologia e espraioamento celular, sendo nos períodos iniciais de 1 e 3 dias classificado como *score* 1, e com sete dias *score* 4 em qual observamos o espraioamento celular de forma bem achatada com emissão de filopódias.

Proliferação e Viabilidade Celular

Os *scaffolds* do Estudo 2 permitiram que as células mantivessem condições de viabilidade e proliferação de forma semelhante (Figura 22). O gráfico demonstra que os materiais tanto em sua forma pura (PHBV) bem como com a adição das partículas de oxipatita dopada com La (PHBV-La₂₀Oap) apresentam menor redução do reagente resazurina em relação às células cultivadas no plástico (C+), porém, mantendo-se viáveis, permitindo inferirmos que os materiais testados não são tóxicos, e podem ser utilizados como alternativa aos auto-enxertos.

Figura 22- Diferença percentual de redução do reagente resazurina nos grupos com *scaffolds* em relação ao grupo controle, determinado pelo teste Alamar Blue[®], em diferentes períodos. (C+ = células cultivadas no poliestireno) ($p > 0,05$ -Two Way ANOVA/ Tukey).

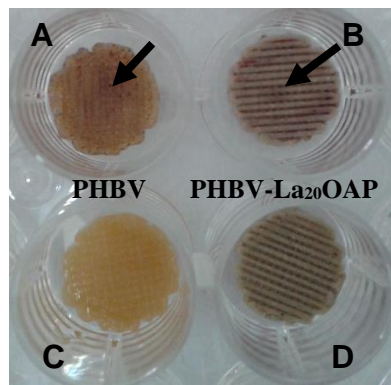


Fonte Elaboração própria.

Formação de matriz extracelular mineralizada

A detecção de nódulos minerais formados nos *scaffolds* foi realizada pelo método de coloração por Vermelho de Alizarina.

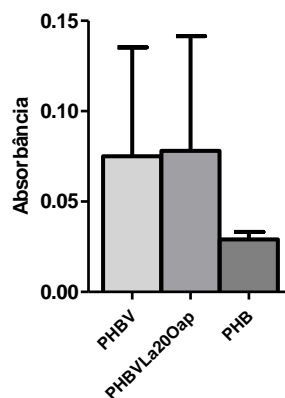
Figura 23- Coloração pelo Vermelho de Alizarina. *Scaffolds* com células: A e B; *scaffolds* sem células (controle negativo): C e D.



Fonte Elaboração própria.

Observamos a formação da matriz mineralizada após 21 dias de cultura celular nos *scaffolds* de PHBV e PHBV-La₂₀OAP (Figura 23A e B) em intensidade semelhante. Os *scaffolds* sem células (controles negativos) não apresentaram formação de nódulos (Figura 23 C e D).

Figura 24- Análise qualitativa da absorvância em relação à formação de nódulos minerais pelas células sobre os *scaffolds* de PHB, PHB-CB e PHB-CB-OGP ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis/ Dunn).



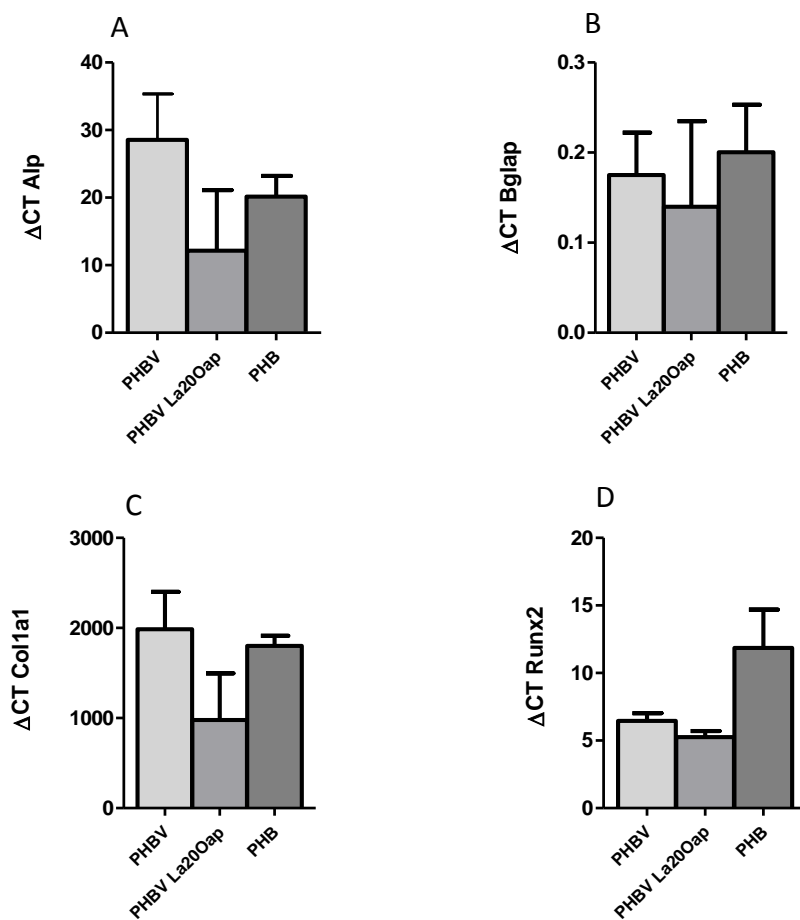
Fonte Elaboração própria.

O gráfico da Figura 24 nos mostra os resultados através da absorvância do corante diluído em solução de cloreto de cetilperidíneo 10% em PBS, e após a normalização das amostras com os controles negativos (*scaffolds* sem células), que não houve diferença estatisticamente significativa com relação à formação de nódulos minerais entre os materiais

Análise da expressão gênica de proteínas indicadoras de diferenciação osteoblástica

A Figura 25 apresenta a expressão gênica da fosfatase alcalina (*Alp*), Osteocalcina (*Bglap*), Colágeno tipo 1- alfa 1 (*Colla1*) e *Runx2* (runt-related transcription factor 2) durante o período de 10 dias.

Figura 25- Análise de expressão de genes indicadores de diferenciação osteoblástica, por meio de PCR-Tempo Real (*Step-One Plus*, Applied Biosystem) ($p > 0,05$ - Kruskal-Wallis/ Dunn).



Fonte Elaboração própria.

A expressão gênica das proteínas indicadoras de diferenciação osteoblástica, não apresentou diferença significativa entre os grupos levando-se em consideração os marcadores utilizados (*Alp*, *Bglap* e *Colla1*), porém observa-se tendência da maior expressão do fator de transcrição *Runx2* para os *scaffolds* de PHB do Estudo 1, sendo o

Runx2 um regulador da expressão de genes relacionados aos processos de mineralização óssea. Desta forma podemos inferir que as células tiveram a capacidade de aderir aos materiais, se diferenciarem e iniciar a mineralização durante o período de 10 dias.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a engenharia de tecidos é uma área promissora no campo da medicina e odontologia com o objetivo de viabilizar com previsibilidade a regeneração óssea ²⁰. Contudo, essa estratégia ainda enfrenta alguns desafios como: encontrar a fonte de células mais adequada, condições ótimas de cultura e o desenvolvimento de matrizes estruturais tridimensionais com características ideais para cada tecido a ser desenvolvido ⁶⁵.

O PHB e o PHBV surgem como uma geração de biopolímeros com ampla aplicação na área médica por serem naturais de fontes renováveis, biocompatíveis, biodegradáveis, e termoplásticos, apresentando propriedades mecânicas adequadas. Por esses motivos, estes polímeros foram escolhidos para o desenvolvimento das matrizes tridimensionais deste estudo.

As micrografias dos *scaffolds* do Estudo 1 obtidas por ensaios de MEV (Figura 4) revelaram que a técnica de impressão de modelos 3D via SLS permitiu a confecção de *scaffolds* de PHB com forma e porosidade adequadas como pré-estabelecidas através do software. Segundo a literatura a porosidade dos *scaffolds* deve ser em torno de 90% ⁷⁸, e como tamanho dos poros entre 200 a 400 μm , quando o objetivo é a regeneração óssea ⁴⁷. A CB associada ou não a apatita, depositada sobre os *scaffolds* de PHB deste estudo apresentou-se como um agregado de cadeias de celulose formada por nanofibras longas e contínuas, distribuídas de forma uniforme tanto na superfície como nos poros dos *scaffolds*, favorecendo a porosidade intrínseca das matrizes 3D, como observado no estudo de Putra et al. ⁶⁰ (2008) , podendo desta maneira auxiliar a adesão e proliferação celular ³⁵.

A incorporação da apatita permitiu a formação de cristais de forma aglomerada. Estes aglomerados são compostos de cristalitos de apatita encontrados em formas do tipo agulha ou lamelar, característicos da fase do fosfato de octacálcio (OCP) ⁵⁴, O fosfato octacálcico apresenta fórmula química $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$ com razão Ca/P=1,33, e ocorre em nosso organismo como composição de cálculos dentários e urinários, sendo fase intermediária durante a formação de ossos e dentes humanos, convertendo-se diretamente a hidroxiapatita ⁵⁷.

Além da forma agulha ou lamelar destes cristais, podem ainda apresentar-se de forma mais arredondada. Segundo Hutchens et al.,³³ (2009) tais aspectos morfológicos indicam que os cristais de OCP com aspecto arredondado podem favorecer a formação de apatita adicional, formando assim partículas interconectadas que crescem mais lateralmente ao redor das nanofibrilas de CB. Esta alteração na morfologia dos cristais de apatita pode ser explicada pela substituição dos íons PO_4^{3-} por íons CO_3^{2-} durante a disposição dos fosfatos de cálcio sobre os *scaffolds* de PHB, resultando na diminuição do tamanho e alteração na forma do cristal para “rods”⁵⁴. Além disto, a estrutura molecular da celulose bacteriana pode contribuir para deposição homogênea dos cristais de apatita. Os grupos hidroxilas da celulose tem dipolo negativo forte, os quais promovem a ligação dos cátions Ca^{2+} livres da solução de CaCl_2 , formando ligações coordenadas, e assim os íons PO_4^{3-} ligam-se ao cálcio associado a CB formando o núcleo inicial para formar as fases precursoras de apatita³³.

Os materiais do Estudo 1 produzidos pela técnica *SLS* podem apresentar uma menor resistência mecânica em relação às outras técnicas de impressão 3D, como “*Fused Deposition Modeling*” (*FDM*), “*stereolithography*” (*SLA*) and “*Three-dimensional Printing*” (*3DP*)⁵⁵, uma vez que a resistência mecânica da matrizes 3D é diretamente influenciada pela geometria dos modelos, levando-se em conta a espessura da haste, e principalmente pelo tamanho dos poros e pela porcentagem de porosidade intrínseca (arquitetura/estrutura do *scaffold*). Entretanto, a estruturação dos modelos deste estudo preocupou-se com a limitação da técnica por *SLS*, levando-se em conta os limites de aumento do tamanho da haste e redução do tamanho dos poros, para não criar somente porosidade intrínseca nos *scaffolds* e não se obter poros maiores interconectados. Além disso, o tamanho do poro tem que ser suficiente para a migração de células osteoblásticas, neste caso, no mínimo de $300 \mu\text{m}$ ³⁵.

A forma do modelo gerado a partir da técnica *SLS* para os corpos de prova, com relação à espessura de haste e ao tamanho dos poros (0,7 mm neste estudo) permitiu o desenvolvimento de *scaffolds* com uma resistência mecânica superior se levarmos em conta os dados da literatura, os quais desenvolveram *scaffolds* com haste menos espessas de 0,5 mm e com os poros maiores de 0,8 mm a 1 mm^{22,21}.

A adição da fase inorgânica (apatitas/fosfatos de cálcio) às matrizes de PHB revestidas com celulose (CB-HA) promoveu a redução da resistência mecânica dos *scaffolds* como observado na Figura 10. Adicionalmente observamos que a quantidade

da CB incorporada ao *scaffold* de PHB não favoreceu o aumento da propriedade mecânica de resistência à compressão dos respectivos *scaffolds* quando hidratados. Desta forma, contradizendo os resultados dos estudos presentes na literatura, nos quais se afirmam que a celulose bacteriana apresenta alta resistência mecânica devido ao entrelace de suas inúmeras fibras nanométricas ^{31,36}.

O método de impressão 3D das matrizes do Estudo 2 por extrusão de filamentos possui a desvantagem de não favorecer a porosidade intrínseca dos materiais, porém pode resultar numa maior resistência mecânica em relação às tecnologias de *SLS*. Além disto, pode promover maior precisão com relação à deposição do material, permitindo a reprodutibilidade do processo; por meio da obtenção de geometrias complexas e controle da morfologia interna relacionada a localização, tamanho e geometria de poros, quando comparada aos outros tipos de processamento de peças 3D de PHB ⁵.

O processo de produção de materiais compósitos por meio da técnica de intercalação no estado fundido empregado por uma extrusora de rosca dupla mostrou-se eficiente para obtenção dos compósitos PHBV- La₂₀OAP sob a forma de filamento com aproximadamente 3 mm de diâmetro, com distribuição homogênea da fase inorgânica pelas cadeias poliméricas, mesmo após o processo de impressão dos *scaffolds*, como pode ser observado nas Figuras 18A-C.

Nas imagens obtidas pelo MEV (Figuras 18A e B) verificamos a ocorrência de microporosidades na superfície e macroporosidades no interior do PHBV-La₂₀OAP. As microporosidades podem ser devido à desgaseificação durante o processo de impressão ou resultante da não fundição total das partículas do material. A imagem em secção transversal (Figura 18C) nos permite observar que há uma íntima aproximação entre as camadas do material sem que houvesse a colabação das mesmas, formando, desta forma, superfície e porosidade adequadas para a adesão e proliferação celular ³⁵.

O lantânio pode atuar no controle das células cancerígenas ³⁴, bem como na ativação ou inibição de osteoclastos dependendo de sua concentração, assumindo assim um efeito benéfico para a saúde humana ⁸⁰. Quando o La é incorporado à rede cristalina das apatitas pode melhorar as propriedades físico-químicas dos materiais bem como radiopacidade, além de aumentar o tempo de liberação das apatitas no organismo, e as características de bioatividade das mesmas ⁶⁶. Alguns estudos tem relatado a associação

das partículas de La às apatitas, porém os resultados das caracterizações físico-químicas e biológicas são pouco discutidos.

O método da incorporação apatita dopada com lantânio ao PHBV deste estudo foi eficaz, como observado por meio do gráfico nos ensaios de MEV/EDS feito para as amostras de PHBV-La₂₀OAP (Figuras 18 e 19), que confirma a presença das partículas de La₂₀OAP de forma homogênea no compósito.

Neste estudo a incorporação de 20 % (m/m) de apatita dopada com La ao PHBV promoveu o aumento do módulo de elasticidade e consequentemente o aumento da resistência do material em relação ao PHBV, uma vez que o módulo de elasticidade para o PHBV com a frequência de 10 Hz foi 1,3 GPa, e para o PHBV-La₂₀OAP cerca de 1,6 GPa (Figura 20). O aumento da resistência mecânica do PHBV-La₂₀OAP é promovido pela incorporação das partículas de oxiatpatita dopada com lantânio. Esta oxiatpatita apresenta uma melhor propriedade mecânica em relação à apatitas sem La, pois a dopagem com La promove uma alteração na rede cristalina dos cristais de apatita fortalecendo sua estrutura ²⁶.

Os resultados dos ensaios *in vitro* para os Estudos 1 e 2 indicaram que os *scaffolds* de PHB com ou sem CB, CB-HA, peptídeo OGP, e os *scaffolds* de PHBV e PHBV-La₂₀OAP, não demonstraram toxicidade a nível celular, permitindo que as células apresentassem morfologia de espraiamento e emissão de filopódias, demonstrando a íntima relação com os materiais. Entretanto as células presentes sobre as superfícies dos *scaffolds* do Estudo 1 contendo CB e CB-HA parecem demonstrar um atraso no estágio de espraiamento, bem como, proliferação celular (Figuras 11B e D). Contudo, quando estas mesmas amostras são analisadas em seção transversal, observamos que as células se encontram em um estágio mais avançado de espraiamento com morfologia classificada como, filopodia-filopodia e lamelipodia-filopodia ^{61, 50} (Figuras 14B-D). Esta diferença de morfologia deve-se ao fato de que a CB ou o compósito CB-HA no interior dos *scaffolds* possui morfologia similar a uma “teia de aranha”, além da microarquitetura porosa do *scaffold* de PHB, cujas estruturas favorecem a adesão e consequentemente o espraiamento celular (Figura 8B).

Segundo a classificação de morfologia celular descrita na literatura, pôde-se observar que as células presentes nos *scaffolds* dos Estudos 1 e 2 apresentam morfologia triangular, rombóide, filopodia-filopodia e lamelipodia-filopodia ^{61, 50}. As células com

morfologia filopodia-filopodia e lamelipodia-filopodia aparecem com mais frequência nos *scaffolds* de PHB, PHB-CB, PHB-CB-OGP quando analisados em seção transversal, e sobre os *scaffolds* de PHBV e PHBV-La₂₀OAP em análise de superfície com período de 7 dias de cultura celular. As morfologias triangular e rombóide estão mais presentes na superfície dos *scaffolds* do Estudo 1 sobre a CB ou CB-HA, e dos *scaffolds* de PHBV e PHBV-La₂₀OAP com período de 1 e 3 dias.

As células sobre a superfície dos *scaffolds* modificados por CB ou CB-HA com ou sem peptídeo osteogênico do Estudo 1 apresentaram dificuldade de desenvolvimento para estágios mais tardios de diferenciação celular, pois não observamos confluência celular em nenhuma das superfícies destas amostras (Figura 13B e D). Ainda assim, as células que aderiram às superfícies apresentaram morfologia com contornos fusiformes ou poliédricos, embora ainda fossem encontradas células com forma esférica.

Alguns estudos *in vitro* prévios realizados com CB demonstraram que as células osteoblásticas foram mais sensíveis nos ensaios de citotoxicidade do que as culturas de células fibroblásticas L929¹³, fato que pode justificar o atraso no espraçamento celular observado para essas culturas sobre as membranas com CB nos primeiros dias de incubação. Também é importante mencionar que a diferença na composição química e na topografia dos *scaffolds* influenciam diretamente na adesão e na proliferação celular, e que esta linhagem de células fibroblásticas L929 são derivadas de tumores, apresentando características de proliferação infinita¹³.

Através das análises por MEV, observamos que as células sobre as superfícies dos *scaffolds* apresentaram uma confluência celular maior durante o período de sete dias quando comparadas ao período de 1 e 3 dias. Tal fato pode ser atribuído à característica de hidrofobicidade do PHBV e PHBV-La₂₀OAP, pois alguns estudos tem relatado maior facilidade de adesão celular em materiais hidrofílicos, uma vez que os mesmos favorecem o processo de adesão dos osteoblastos aos materiais⁷⁴.

Os ensaios para avaliação da viabilidade e proliferação celular (Figura 15 A, 15 B e 22) revelaram que os *scaffolds* do Estudo 1 e Estudo 2 permitiram a manutenção das células viáveis bem como a proliferação celular, uma vez que o corante resazurina é metabolizado somente por células viáveis como descrito na metodologia.

Nas análises intra e intergrupos (Figura 15 A e 15 B) do Estudo 1 observamos que ao semear as células sobre os *scaffolds* de PHB, PHB-CB e PHB-CB-OGP, as mesmas se mantiveram viáveis durante todo período do experimento de 21 dias, contudo entre o período de 9 a 15 dias observamos um destaque para a proliferação celular. Porém, as células presentes nos *scaffolds* de PHB(CB-HA)-OGP apresentaram menores taxas de viabilidade e proliferação confirmando os resultados obtidos por meio da análise por MEV.

Um fator que pode ser atribuído ao atraso dessas culturas é o processo dinâmico de troca iônica entre íons cálcio e fosfato entre material/células, o que pode não ter ocorrido de forma expressiva no sistema *in vitro*, como ocorre naturalmente *in vivo*. Dessa forma, pode ter ocorrido um aumento da osmolaridade do meio de cultura devido a presença de grande quantidade de íons Ca^{2+} provenientes do compósito CB-HA, podendo inibir a proliferação celular. A alteração da osmolaridade pode alterar o pH elevando-o a níveis acima das condições ideais para o crescimento celular, levando maior tempo para o restabelecimento aos valores desejáveis (pH do meio próximo ao pH plasmático, 7,2-7,4) necessário *in vitro*, pois o reequilíbrio do pH é diretamente dependente da realização das trocas do meio de cultura a cada 2-3 dias. Já em sistemas biológicos, a reposição de íons são constantes favorecendo o equilíbrio do pH na interface material/tecido. Esta hipótese poderia justificar o atraso na adesão celular nos primeiros dias de incubação e da morfologia esferoidal das células, pois o aumento da concentração de íons Ca^{2+} no meio pode levar a uma redução da viabilidade celular ⁴².

Apesar da menor proliferação celular sobre os *scaffolds* com CB-HA, outros estudos *in vitro* demonstraram que este compósito não é citotóxico e pode promover a adesão, proliferação e diferenciação celular de linhagem de células osteoblásticas de medula óssea humana (HBMSC) FANG B e de linhagem osteoblástica MC3T3-E1 ⁸³. Além disso membranas de CB-HA não foram citotóxicas, genotóxicas nem mutagênicas ⁶³.

Para os *scaffolds* de PHBV e PHBV-La₂₀OAP do Estudo 2 observamos um pico de proliferação celular no período de 9 dias, porém sem diferença significativa entre os períodos e entre os grupos (Figura 22). Essa diminuição na proliferação e viabilidade inicial pode ser devido à hidrofobicidade dos polímeros, sendo esta diretamente relacionada à adesão celular ⁷⁴. Esta, por sua vez, também é associada às características da superfície e porosidade das matrizes, uma vez que o tipo de impressão utilizada para

a confecção das mesmas, foi diferente dos *scaffolds* pertencentes ao Estudo 1⁵. Este tipo de impressão similar a FDM imprime estruturas 3D com uma superfície menos porosa.

Entretanto mesmo com a proliferação celular mais tardia, observamos que o PHBV e o PHBV-La₂₀OAP não apresentaram características de toxicidade celular, permitindo que as células se mantivessem viáveis e proliferassem durante 21 dias de experimento. Em concordância, há um estudo no qual fabricaram *scaffolds* de PHBV com diferentes tamanhos e orientações das fibras, sendo estes fatores que interferem diretamente na adesão de células de medula óssea de ratos⁴⁴.

A partir do momento que as matrizes são implantadas nas regiões dos defeitos ósseos as células mesenquimais provindas do tecido ósseo do leito receptor aderem-se aos *scaffolds* e proliferam-se, podem diferenciar-se em células osteoblásticas, e desta maneira iniciarem um processo de ossificação\ mineralização óssea⁷³.

Em experimentos in vitro algumas linhagens celulares podem ser induzidas a mineralizarem a matriz óssea por meio da adição de alguns componentes aos meios de cultura celular, como exemplo β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona¹⁹. Para a avaliação in vitro dos processos de mineralização óssea podemos citar os métodos de coloração de Von Kossa, Vermelho de Alizarina, e fluorescência com calceína.

O Vermelho de Alizarina apresenta coloração castanha e possui grande afinidade pelos grupos fosfato de cálcio, além de ser facilmente aplicável aos materiais, pois forma uma monocamada sobre as amostras que pode ser facilmente removida por meio de lavagem das superfícies coradas. A maior intensidade da coloração é diretamente proporcional à quantidade destes fosfatos depositados sobre os *scaffolds*. A coloração das amostras do Estudo 1 e 2 foi observada quantitativamente, e com esta análise observou-se que as células semeadas sobre os *scaffolds* foram capazes de promover a mineralização, confirmando as características fenotípicas observadas durante todo estudo²⁵.

Considerando a estrutura tridimensional dos *scaffolds*, no presente estudo o corante impregnado nas amostras foi solubilizado para quantificação em leitor de microplacas. Para evitar interferência de características intrínsecas de cada matriz nesta análise, amostras de *scaffolds* sem cultura celular também foram coradas, e os valores de absorvância obtidos foram utilizados como background para os respectivos *scaffolds*

com cultura celular. Após normalização dos resultados, a mineralização da matriz foi confirmada, porém não foi observada diferença significativa entre os diferentes tipos de *scaffolds*, após 21 dias de cultura celular.

Contudo, os *scaffolds* de PHB-CB-OGP apresentaram tendência maior de mineralização (Figura 16 C), sugerindo que o peptídeo OGP pode ter favorecido esse processo. Em um estudo feito com ratas que sofreram ovariectomia, e consequente perda de densidade óssea, demonstrou que o tratamento com o OGP pode estimular a atividade dos osteoblastos promovendo a ossificação ¹⁴. Adicionalmente, ressaltamos outros estudos que demonstraram o papel benéfico do OGP no tratamento de fraturas ósseas em coelhos e ratos, uma vez que no processo de consolidação os grupos tratados com o peptídeo apresentaram reparos com maior densidade óssea, que os grupos não tratados ^{68, 8, 63}.

Poucos estudos são encontrados na literatura utilizando ensaios com Vermelho de Alizarina em *scaffolds* de PHBV. Um estudo feito por LIU et al., ⁴³ (2007) com células osteoblásticas UMR-106, avaliaram a presença de nódulos minerais decorrentes das células cultivadas sobre o plástico e sobre *scaffolds*, e observaram a ocorrência de uma maior mineralização pela presença mais intensa do corante sobre matrizes de PHBV quando comparado aos controles, em um período de 14 dias.

Complementando os experimentos anteriores, a expressão gênica de moléculas associadas à diferenciação osteoblástica e mineralização foi avaliada em *scaffolds* de PHB, PHBV e PHBV-La₂₀OAP.

Os *scaffolds* de PHB apresentaram uma tendência no aumento do fator de transcrição *Runx2* quando comparados aos outros grupos. Estes resultados podem ser explicados pela diferença de impressão utilizada para cada Estudo em questão, uma vez que a superfície do *scaffold* quando alterada, interfere diretamente na adesão e proliferação celular ³⁵, podendo causar atraso no processo de mineralização.

Kumarasuriyar et al., ³⁹ (2005) compararam a mineralização óssea de células semeadas em matrizes tridimensionais à base do polímero PHBV, e verificaram que a adesão e proliferação celular foi melhor para as células cultivadas sobre o plástico, levantando a hipótese de que para vencerem as dificuldades com relação à geometria da superfície e à hidrofobicidade do material, as células demandam tempo para expressarem na matriz celular moléculas responsáveis pelas proteínas de adesão, porém

mesmo sendo levado em contas estas dificuldades as *RBMSC* cultivadas sobre as diferentes matrizes tridimensionais à base de PHB, e PHBV dos Estudos 1 e 2 deste trabalho apresentaram capacidade de adesão, proliferação e diferenciação, evoluindo para a mineralização da matriz.

Segundo os resultados deste trabalho podemos inferir que a adição do OGP aos *scaffolds* de PHB revestidos com CB acelerou a formação de nódulos minerais, sugerindo um efeito benéfico deste peptídeo na diferenciação celular, enquanto que a adição da HA prejudicou a resistência mecânica dos *scaffolds* bem como a proliferação celular sobre os mesmos, e a adição do La aos *scaffolds* de PHBV não promoveu efeitos adicionais com relação à adesão, proliferação e formação de nódulos minerais, e adicionalmente não apresentou citotoxicidade .

Estudos adicionais in vivo e in vitro com os *scaffolds* são necessários para determinar seu real benefício em condições na regeneração de diferentes tipos de defeitos ósseos.

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-butilato) e poli(hidroxi-butilato-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.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
 "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Câmpus de Araraquara
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 32/2014

Araraquara, 29 de outubro de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "*SCAFFOLDS DE POLIHIDROXIBUTIRATO E POLI (E-CAPROLACTONA) CONSTRUÍDOS POR PROTOTIPAGEM RÁPIDA FUNCIONALIZADOS COM COMPÓSITOS A BASE DE CELULOSE BACTERIANA ASSOCIADOS COM PEPTÍDEO OSTEOGÊNICO, FIBROÍNA E HIDROXIAPATITA*" (Proc. CEUA nº 32/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para MAIO/2016.

Atenciosamente.

Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
 Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
 DD. Pesquisador Responsável
 Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 29 de Março de 2016.

MARIANA ALINE COMINOTTE