

Thalita Marcolan Valverde

**Avaliação de biocompósitos à base de colágeno I, agregado trióxido de mineral e nanotubos de carbono de paredes múltiplas na regeneração óssea**

Belo Horizonte - MG

Setembro de 2015

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Morfologia  
Pós-Graduação em Biologia Celular

Thalita Marcolan Valverde  
Orientador: Gregory Thomas Kitten  
Coorientadora: Elisandra Gava de Castro

**Avaliação de biocompósitos à base de colágeno I, agregado trióxido de mineral e nanotubos de carbono de paredes múltiplas na regeneração óssea**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

Belo Horizonte - MG  
Setembro de 2015

*Dedico este trabalho àqueles que  
fazem parte de mim: minha  
família!*

## Agradecimentos

Agradeço a DEUS pela proteção e por ter me ajudado a manter o equilíbrio psicológico necessário nos momentos de maior dificuldade deste trabalho. À minha família, por ser parte de mim e, especialmente, ao meu esposo Rodrygo, meu companheiro de vida, por tudo que representa em minha vida, pela ajuda científica e emocional ao longo deste percurso. Aos meus orientadores, Prof. Gregory e Elisandra, pela orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho, e por serem pessoas de grande importância na minha formação profissional.

Agradeço às Profas. Annamaria e Cleida, pela orientação didática nas aulas de CHG durante o período de docência junto ao REUNI. À Profa. Luciana Andrade, pelo exemplo de profissional, e aos amigos de laboratório (LBCM), por compartilharem comigo momentos de alegria e pelo exemplo de trabalho em equipe. Em especial, aos alunos de iniciação científica Lívia, Maíssa e Victor, por tanto terem contribuído na realização dos experimentos e nas análises, e por serem pessoas tão especiais.

Obrigada aos colegas do Laboratório de Biologia Cardíaca, na pessoa do Prof. Anderson e especialmente a doutoranda Vanessa Andrade, pela colaboração nos experimentos *in vivo* desde as cirurgias até as análises, obrigada pelo profissionalismo dedicado e pela amizade. À Profa. Marivalda Magalhães e ao doutorando Breno Rocha (DEMET-UFMG), pela colaboração nas análises de microtomografia computadorizada. Ao Prof. Marcelo Calliari (ICB/UFMG), pela disponibilidade e colaboração nas análises histomorfométricas do estudo *in vivo*. Ao Prof. Gustavo Menezes, pela ajuda na realização da morfometria do estudo *in vitro*.

Agradeço ao Prof. Paulo Tambasco e ao técnico Roger (USP-Ribeirão Preto), por disponibilizar as células deste estudo e pelo treinamento com a obtenção das culturas primárias. Ao Prof. Luís Orlando, por disponibilizar os nanotubos de carbono utilizados neste estudo. À Profa. Mônica Cotta (UNICAMP), pela disponibilidade nas análises físico-químicas do biocompósito. Aos funcionários do Centro de Microscopia e CAPI / UFMG, pela realização das microscopias eletrônicas.

Agradeço à Pós-graduação em Biologia Celular na pessoa da professora e coordenadora Cristina Guatimosin e a todos os professores pelos ensinamentos e oportunidades a mim concedidas ao longo deste curso. Obrigada aos amigos do departamento de Morfologia, especialmente Tatiane, Mônica e Marcos, pela amizade e por tornarem esse tempo mais leve. Às agências de fomento, Capes e Fapemig, pelo financiamento deste projeto.

A todos que, de alguma forma, fizeram a diferença ao longo desse ótimo tempo!

# Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Mecanismos celulares na regeneração e remodelamento ósseo .....	1
1.2 Engenharia tecidual e regeneração óssea.....	4
1.3 Aplicações de biomateriais tridimensionais na regeneração óssea.....	7
1.3.1 Agregado trióxido de mineral.....	9
1.3.2 Nanotubos de carbono .....	10
2. Justificativa.....	14
3. Objetivos .....	15
4. Metodologia.....	16
4.1 Estudos <i>in vitro</i> .....	16
4.1.1 Células .....	16
4.1.2 Preparação do gel de colágeno tipo I.....	17
4.1.3 Síntese dos nanotubos de carbono .....	17
4.1.4 Agregado Trióxido de Mineral .....	18
4.1.5 Preparo do biocompósito .....	18
4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	19
4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	21
4.1.8 Análise das propriedades mecânicas .....	23
4.1.9 Ensaio de viabilidade celular .....	24
4.1.10 Ensaio de proliferação celular .....	25
4.1.11 Ensaio de migração celular em 3 dimensões .....	25
4.1.10 Análise da mineralização de osteoblastos em biocompósitos tridimensionais.....	27
4.2 Estudos <i>in vivo</i> .....	29
4.2.1 Aplicação do biocompósito em defeito ósseo de tíbias de ratos.....	29
4.2.2 Microtomografia computadorizada .....	32
4.2.3 Processamento histológico .....	33
4.2.4 Análise histológica e morfométrica .....	34
4.2.5 Análise estatística .....	35
5. Resultados .....	36
5.1 Análises <i>in vitro</i> .....	36
5.1.1 Análise morfológica dos biocompósitos e interações celulares.....	36
5.1.2 Análise da viabilidade dos osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais.....	42
5.1.3 Análise da migração de osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais .....	46
5.1.4 Análise da mineralização de osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais.....	48

5.2 Análises <i>in vivo</i> .....	50
5.2.1 Análise histológica da regeneração óssea.....	50
5.2.2 Análise morfológica da regeneração óssea.....	56
5.2.3 Avaliação da microtomografia computadorizada.....	58
5.2.3.1 Análise da reconstrução 2D da regeneração óssea .....	58
5.2.3.2 Análise da reconstrução 3D da regeneração óssea .....	60
5.2.3.3 Análise quantitativa e morfológica da micro-CT da regeneração óssea.....	63
6. Discussão.....	68
7. Conclusões.....	73
8. Referências .....	74

## **Lista de abreviaturas**

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

DAPI: 4-6-diamidino-2-phenylindole

FBS: Fetal Bovine Serum

MEC: Matriz Extracelular

$\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium Alpha

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MTA: Mineral Trioxide Aggregate

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor KappaB

nanoHA: nanopartículas de Hidroxiapatita

NTC: Nanotubos de Carbono

NTCPM: Nanotubos de Paredes Múltiplas

NTCPS: Nanotubos de Parede Simples

PBS: Phosphate Buffered Saline

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand

## Lista de figuras

Figura 1: Regeneração de fratura de fêmur em rato. ....	3
Figura 2: Representação esquemática de NTCs.....	11
Figura 3: Esquema do arranjo do biocompósito. ....	19
Figura 4: Procedimento cirúrgico de defeito ósseo em tíbia de ratos e aplicação de biocompósito.....	31
Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura dos biocompósitos. ....	38
Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes biocompósitos. ....	39
Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão dos biocompósitos.....	40
Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes biocompósitos. ....	41
Figura 9: Microscopia de fluorescência das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos por 48 horas. ....	44
Figura 10: Quantificação da viabilidade das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos no período de 24 e 48 horas. ....	45
Figura 11: Quantificação da migração das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos no período de 48 horas.....	47
Figura 12: Análise de diferenciação osteoblástica.....	49
Figura 13: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias após cirurgias para realização de defeito ósseo e tratadas com biocompósitos por 7 dias. ....	51
Figura 14: Quantificação morfométrica da formação de trabéculas ósseas na regeneração de tíbias após 7 dias de tratamento com diferentes biocompósitos.....	57
Figura 15: Reconstrução 2D das tíbias submetidas a defeito ósseo e tratamento por 7 dias com diferentes biocompósitos. ....	59
Figura 16: Reconstrução 3D das tíbias submetidas a defeito ósseo e tratamento por 7 dias com diferentes biocompósitos. ....	61
Figura 17: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT do osso após o tratamento de 7 dias com colágeno I em diferentes concentrações.....	65
Figura 18: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT da regeneração óssea após o tratamento de 7 dias com os biocompósitos em diferentes concentrações. ....	66

## Lista de tabelas

Tabela 1: Biomateriais naturais e sintéticos usados para regeneração óssea.....	6
Tabela 2: Delineamento dos cinco grupos experimentais avaliadas por MEV. ....	20
Tabela 3: Delineamento dos três grupos experimentais avaliados por MET.....	21
Tabela 4: Delineamento dos grupos experimentais para o ensaio de viabilidade celular.....	24
Tabela 5: Delineamento dos quatro grupos experimentais do ensaio de migração celular. ....	26
Tabela 6: Delineamento dos quatro grupos experimentais da avaliação de matriz mineralizada. ....	28
Tabela 7: Delineamento dos grupos experimentais do estudo <i>in vivo</i> . ....	30

## Resumo

Atualmente, um dos maiores desafios da medicina regenerativa é o desenvolvimento de biomateriais para a regeneração do tecido ósseo. Nesta tese, caracterizamos scaffolds tridimensionais compostos por colágeno I, agregado trióxido de mineral (MTA) e/ou nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) para uso na regeneração do tecido ósseo. O colágeno provê um scaffold fisiologicamente relevante, o que permite a adesão e a ocorrência de migração de osteoblastos. O MTA tem uma composição química similar à de componentes minerais do osso e é usado como um cimento em aplicações endodônticas, onde apresenta atividades osteoindutoras, sugerindo que, em uma forma dispersa, pode prover sítios de nucleação óssea por todo o biocompósito. NTCPMs foram incluídos uma vez que foi observada sua capacidade de aumentar a estabilidade mecânica de géis de colágeno. Os objetivos desta tese foram determinar as concentrações ótimas de colágeno, MTA e NTCPM necessárias para a viabilidade, migração e diferenciação de osteoblastos *in vitro* e testar os biocompósitos quanto ao seu potencial osteoindutor *in vivo*. Pré-osteoblastos (MC3T3-E1) foram cultivados sobre ou dentro de scaffolds contendo diferentes concentrações de colágeno, MTA e NTCPM e suas respostas celulares foram determinadas em diferentes períodos. A viabilidade celular observada foi superior a 95% para todas as variações do biocompósito testadas *in vitro*. A migração celular no interior dos biocompósitos também ocorreu eficientemente, exceto na presença de NTCPM. Algumas concentrações de MTA ou NTCPM, ou ainda combinações de ambos, causaram um aumento na mineralização dos biocompósitos. Para os estudos *in vivo* um defeito de 1,6 mm foi realizado no osso tibial de ratos e preenchido com o biocompósito. Após sete dias, amostras foram coletadas e analisadas através de microtomografia computadorizada e análise histomorfométrica. Os resultados obtidos indicaram um aumento significativo na mineralização e maturação expressiva de osso trabecular neoformado na presença do scaffold de colágeno I puro, mas apenas pequenos aumentos com a adição de MTA e/ou NTCPM em comparação aos controles. Assim, esses novos biocompósitos à base de colágeno I, MTA e NTCPM mostraram potencial como scaffolds fisiologicamente relevantes para uso na regeneração do tecido ósseo.

## Abstract

One of the main challenges of regenerative medicine is the development of biomaterials for bone tissue regeneration. In this thesis, we characterize 3D biocomposite scaffolds composed of type I collagen plus mineral trioxide aggregate (MTA) and/or multiwall carbon nanotubes (MWCNT) for use in bone tissue regeneration. Collagen provides a physiologically relevant scaffold, which allows osteoblast adhesion and migration to occur. MTA has a chemical composition similar to the mineral components of bone and is used as a material in endodontical applications, where it displays osteoinductive activities, suggesting that in a dispersed form it may provide bone nucleation sites throughout the scaffold. MWCNT were included since they have been shown to increase the mechanical stability of collagen gels. The objectives of this thesis were to determine the optimal concentrations of collagen, MTA and MWCNT necessary for osteoblast viability, migration, and differentiation *in vitro* and then test the biocomposites for osteoinductive potential *in vivo*. Pre-osteoblasts (MC3T3-E1) were cultured on or in biocomposite scaffolds containing different concentrations of collagen, MTA and MWCNT and then the cellular responses were determined at various time points. Viability was > 95% for all variations of the biocomposite tested *in vitro*. Migration into scaffolds also occurred efficiently, except in the presence of high concentrations of MWCNT. Specific concentrations of either MTA or MWCNT, or combinations of MTA + MWCNT, caused an increase in mineralization of scaffolds. For *in vivo* studies, a 1.6 mm diameter defect was made in the tibial bone of rats and filled with biocomposite. After seven days, samples were collected and analyzed using computerized micro-tomography and histological-morphometric analysis. The results obtained thus far indicate a significant increase in mineralization and advanced maturation of newly-formed trabecular bone in the presence of collagen scaffold alone, but only slight increases when MTA and/or MWCNT are present as compared to controls. Thus, these novel type I collagen / MTA / MWCNT biocomposites show potential as physiologically relevant scaffolds for use in bone tissue regeneration.

# 1. Introdução

## 1.1 Mecanismos celulares na regeneração e remodelamento ósseo

A regeneração da perda óssea é um problema clínico importante em todo o mundo. De fato, o osso é o tecido mais implantado depois do sangue: quase sete milhões de fraturas ósseas ocorrem anualmente somente nos Estados Unidos e a previsão é que esses números aumentem dramaticamente com o envelhecimento da população (Thein-Han and Xu 2011). No entanto, as pequenas fraturas ósseas podem ser curadas naturalmente sem intervenção clínica, o que demonstra uma plasticidade do tecido ósseo na regeneração, trabalhando em constante remodelamento durante a vida do organismo (Phan *et al.*, 2004).

Fisiologicamente, o osso é um tecido conjuntivo especializado com células imersas em uma matriz calcificada, dinâmico, altamente vascularizado, com capacidade de reparar-se sem cicatrizes (Shapiro *et al.*, 2014). A matriz óssea é composta por uma parte inorgânica rica em cristais de hidroxiapatita e uma parte orgânica composta por colágeno I, além da presença de células da linhagem óssea, vasos sanguíneos, nervos e fluido extracelular (Castillo and Leucht 2015). A diversidade funcional ampla do tecido ósseo é refletida por sua complexa arquitetura tecidual, sendo o tecido organizado em duas maneiras distintas: o osso trabecular (medular) e o osso compacto (cortical). O osso trabecular apresenta inúmeros poros e é por isso denominado osso esponjoso, sendo essas cavidades porosas preenchidas por uma grande parte da medula óssea. Por outro lado, o osso compacto é contínuo, apresenta poucos poros, abriga a maioria da população de osteócitos e é responsável por espalhar sinais mecânicos originados do ambiente externo. Tais sinais podem desencadear vários reflexos que regulam a atividade de osteoblastos e osteoclastos no remodelamento ósseo (Gemini-Piperni *et al.*, 2014).

O remodelamento ósseo é um processo mediado por ações em conjunto de osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e células de revestimento ósseo (Robling *et al.*, 2006). A proliferação, diferenciação e as atividades dessas células são controlados por fatores locais e sistêmicos (Phan *et al.*, 2004). O início da fase do remodelamento ósseo começa com a reabsorção óssea pelos osteoclastos, seguida pela fase de formação óssea pelos osteoblastos, com uma fase de transição entre essas duas. O ciclo é então completado por ações coordenadas de osteócitos e células do revestimento ósseo (Sims and Gooi 2008).

Por ação de fatores osteoclastogênicos como o ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) e fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), as células

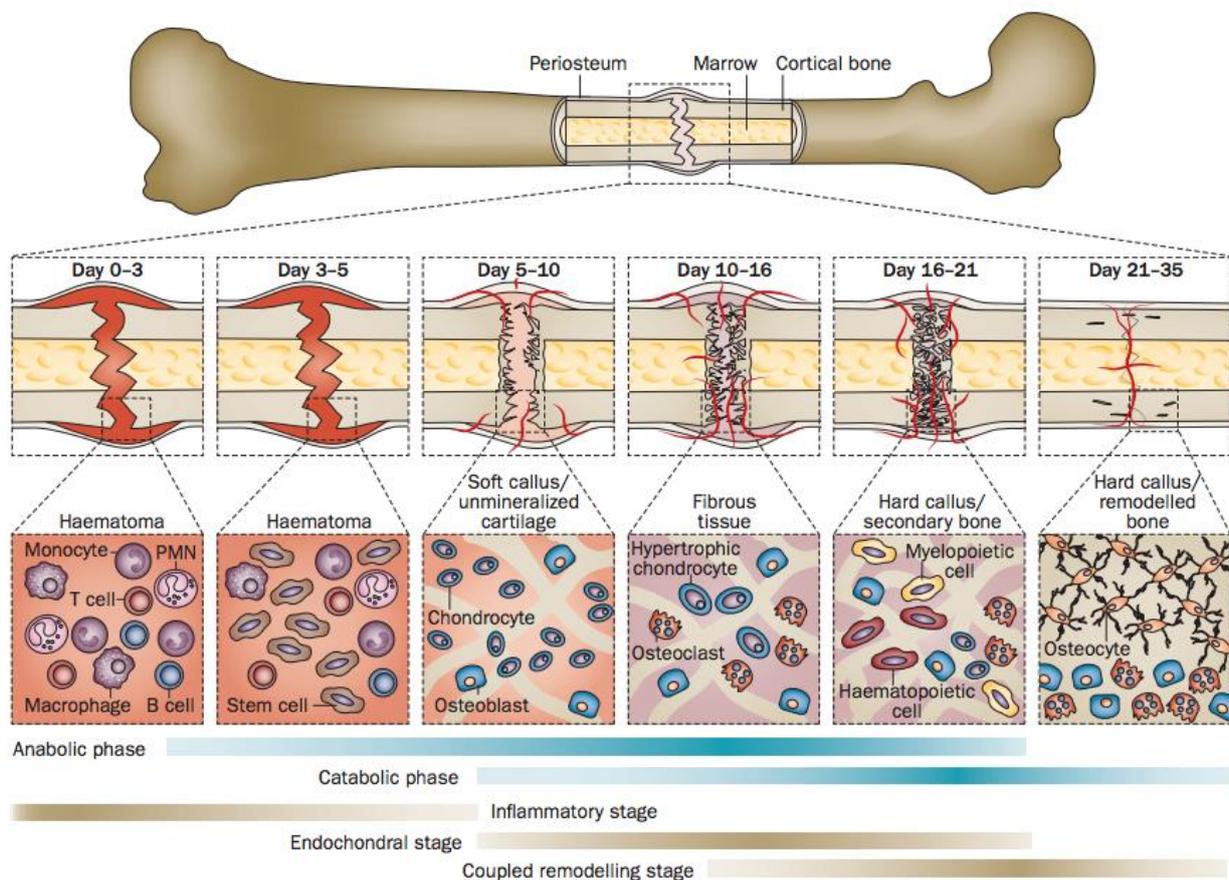
tronco hematopoiéticas são recrutadas para áreas específicas da superfície do osso e diferenciam-se em osteoclastos maduros, iniciando assim a reabsorção óssea (Nakashima *et al.*, 2011). Adicionalmente, alguns fatores, como fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), fatores transformadores do crescimento (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e fator derivado do crescimento de plaquetas (PDGF) parecem atuar de maneira acoplada, uma vez que são armazenados na matriz óssea e liberados durante a reabsorção óssea (Linkhart *et al.*, 1996). Estudos recentes sugerem que outra categoria de moléculas denominadas semaforinas estejam envolvidas na comunicação das células ósseas durante a remodelação óssea (Negishi-Koga *et al.*, 2011; Negishi-Koga and Takayanagi 2012).

Sob a influência de vários fatores, os osteócitos harmonizam a remodelação óssea, produzindo fatores que influenciam as atividades dos osteoblastos e osteoclastos (Rochefort *et al.*, 2010). A apoptose de osteócitos atua como uma sinalização quimiotática que recruta osteoclastos para o local (Noble *et al.*, 1997; Verborgt *et al.*, 2000). Consequentemente, tem sido relatado que os osteoclastos fagocitam osteócitos apoptóticos, sugerindo que osteoclastos são capazes de fagocitar células ósseas que morrem no local da remodelação óssea (Cerri *et al.*, 2003; Plotkin 2014). Há também relatos de que osteócitos viáveis são capazes de produzir fatores osteoclastogênicos (ex: RANKL) nas proximidades de osteócitos que estão em apoptose, a fim de recrutar osteoclastos (Nakashima *et al.*, 2011).

Assim como no remodelamento, a regeneração óssea – problema central abordado nesta tese – é coordenada por vários tipos celulares a fim de formar um novo osso. A regeneração óssea envolve uma fase de modelagem inicial (fase anabólica) que se caracteriza por um aumento em volume tecidual, relacionado com o recrutamento e diferenciação de células tronco em células ósseas e vasculares. Adjacente à linha da fratura, um calo cartilaginoso forma-se e, nas bordas dos novos tecidos cartilagosos, o periósteo incha-se e inicia-se a formação do osso primário (Phillips 2005; Einhorn and Gerstenfeld 2015). Concomitante ao desenvolvimento do tecido cartilaginoso, células que formarão vasos sanguíneos são recrutadas e diferenciam-se ao redor do músculo (Kurdy *et al.*, 1996). O aumento no leito vascular cresce para dentro do calo, o que é refletido pelo fluxo sanguíneo aumentado dentro da área do tecido reparado. Conforme a diferenciação dos condrócitos progride, a matriz extracelular da cartilagem é mineralizada e a fase de modelamento anabólica termina com apoptose dos condrócitos (Lee *et al.*, 1998; Einhorn and Gerstenfeld 2015).

Uma nova fase prolongada inicia-se (fase catabólica), caracterizada pela redução no volume do calo ósseo. Durante essa fase, atividades como a reabsorção da cartilagem seguida de formação óssea secundária são iniciadas. Posteriormente, quando a remodelação óssea começa, a primeira matriz mineralizada produzida durante a formação do osso primário é reabsorvida pelos osteoclastos

e, em seguida, o osso secundário também é reabsorvido. Como o calo ósseo continua a ser reabsorvido, esse período é caracterizado por ciclos alternados de atividade de osteoclastos e osteoblastos, em que os calos são remodelados para dar estruturação ao osso cortical. Durante esse período, o espaço medular é reestabelecido e a medula óssea é regenerada. No período final dessa fase prolongada, ocorre uma extensa remodelação vascular, o fluxo vascular que havia sido aumentado regride e o fluxo vascular normal permanece (Melnik *et al.*, 2008). A visão geral das fases metabólicas e os eventos biológicos da regeneração de fraturas estão representados na Figura 1.



Fonte: Einhorn and Gerstenfeld (2015)

**Figura 1: Regeneração de fratura de fêmur em rato.** As principais fases metabólicas (anabólica e catabólica) da regeneração óssea estão denotadas nas barras em azul e os estágios biológicos (endocondral, inflamatório e remodelamento) nas barras em marrom. Os principais tipos celulares estão esquematizados em cada etapa e a escala de tempo é equivalente a uma fratura de fêmur de rato.

## 1.2 Engenharia tecidual e regeneração óssea

A regeneração de defeitos ósseos críticos representa um dos maiores desafios para o sucesso em tratamentos da ortopedia e odontologia. Antes de existir a medicina regenerativa e os enxertos ósseos, grandes fraturas levavam, na maioria dos casos, a amputações. A história da medicina regenerativa relata que a primeira tentativa de enxerto ósseo foi realizada por um médico cirurgião em 1668 (Lane and Sandhu 1987). Desde então, a área evoluiu para uma ciência interdisciplinar que tem desenvolvido diversos tratamentos para vários tipos de defeitos ósseos (Gupta *et al.*, 2013; Einhorn and Gerstenfeld 2015).

Ao contrário de pequenas fraturas ósseas, que podem ser curadas naturalmente, defeitos ósseos críticos causados por acidentes com fraturas expostas ou ressecção tumoral requerem procedimento cirúrgico e reposição tecidual (Spin-Neto *et al.*, 2013). Nesses casos, uma alternativa para o preenchimento ósseo é o enxerto, uma vez que esse método de tratamento consegue adicionar altura, volume e comprimento para a estrutura do esqueleto a ser reparada. Existem diferentes tipos de enxertos ósseos utilizados na clínica, os quais são classificados como aloenxertos, xenoenxertos, autoenxertos e aloplásticos ou sintéticos (Shibuya and Jupiter 2015).

Os aloenxertos são adquiridos de seres humanos, na maioria das vezes provenientes de um banco de ossos e compreendem o enxerto entre indivíduos da mesma espécie. Eles podem ser preparados por meio de processamentos distintos e, devido a isso, suas propriedades biológicas podem variar amplamente. Em geral, o processo de esterilização é vigoroso a fim de eliminar as transmissões de doenças. Entretanto, esse processo pode reduzir as propriedades osteogênicas e comprometer a formação óssea (Shibuya and Jupiter 2015). Outras limitações importantes a serem consideradas em relação ao aloenxerto são a elevada rejeição tecidual e o alto custo financeiro (Ehrler and Vaccaro 2000).

Os xenoenxertos podem ser adquiridos de uma variedade de espécies, incluindo bovinos, porcinos e equinos, os quais são geralmente biocompatíveis com a estrutura do osso humano (Develioglu *et al.*, 2009). Esses enxertos são osteocondutores, capazes de guiar a formação óssea passivamente por meio da própria matriz. Por outro lado, não são osteoindutores, ou seja, não levam as células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos por meio de proteínas indutivas (AlGhamdi *et al.*, 2010). Uma das principais preocupações com os xenoenxertos é a potencial transmissão de doenças zoonóticas, como a encefalopatia espongiforme ocasionada pela infecção por príons em bovinos (Oryan *et al.*, 2014).

Os autoenxertos são considerados o *padrão ouro* na regeneração de pequenos e médios defeitos ósseos. São obtidos a partir de áreas específicas do esqueleto do próprio paciente, por

exemplo: osso parietal, mandíbula e crista ilíaca, respeitando o tratamento escolhido e a extensão da lesão (Gulan *et al.*, 2012). O osso autógeno tem uma forte característica osteogênica e é também considerado osteoindutor e osteocondutor, propriedades que potencializam a formação óssea. Apesar desses benefícios, o osso autógeno apresenta algumas desvantagens, tais como: necessidade de novo procedimento cirúrgico sob sedação geral para se obter o enxerto, limitação da quantidade e disponibilidade de osso, longo período de recuperação, susceptibilidade a infecção e progressiva reabsorção óssea (Oryan *et al.*, 2014). Tais inconvenientes têm levado pesquisadores a desenvolver novos materiais para reposição óssea, que associem vantagens obtidas no enxerto autólogo, mas sem apresentar os efeitos indesejáveis.

Nesse cenário, uma grande variedade de biomateriais têm sido propostos, tais como polímeros sintéticos e naturais, cerâmicas, metais e os compósitos (Garcia-Gareta *et al.*, 2015). Um biomaterial de qualidade deve permitir a adesão, migração e diferenciação das células osteoprogenitoras, eventos celulares essenciais que garantem a osseointegração (Bertazzo *et al.*, 2010; Zambuzzi *et al.*, 2012). Outro fator interessante que merece atenção é o tempo de absorção do material, o qual deve seguir a neoformação do tecido ósseo lesionado (de Oliveira *et al.*, 2008). No entanto, apesar do avanço técnico na fabricação dos substitutos ósseos, a aplicação clínica requer bastante cautela, pois é preciso balancear as limitações que cada grupo de biomaterial apresenta na regeneração óssea (Garcia-Gareta *et al.*, 2015). Em particular, a combinação de biomateriais na forma de compósitos pode explorar as qualidades e atenuar as limitações individuais de cada material. A Tabela 1 sumariza os diferentes grupos de substitutos ósseos naturais e sintéticos com suas respectivas vantagens e desvantagens na aplicação.

<b>Biomateriais</b>	<b>Exemplos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	
<i>Polímeros</i>	<i>Naturais</i>	<u>Proteínas</u> : colágeno, fibrina, gelatina <u>Polissacarídeos</u> : ácido hialurônico, sulfato de condroitina, celulose, alginato e quitosana	Biodegradáveis Biocompatíveis Bioativos	Baixa força mecânica Altas taxas de degradação Variações de lote
	<i>Sintéticos</i>	Ácido poliglicólico (PGA) Ácido poli-lático (PLA) Ácido poli-caprolactona (PCL) Ácido polilático – poliglicólico (PLGA) Ácido poli-hidroxietilmetacrilato (poli-HEMA)	Biodegradáveis Biocompatíveis Versatilidade	Baixa força mecânica Alta concentração local de produtos de degradação ácida
<i>Cerâmicas</i>	<i>Fosfato de cálcio</i>	Hidroxiapatita sintética (HA) Silicato Fosfato tricálcico-β (β-TCP) Fosfato bicálcico desidratado (DCPD)	Biocompatíveis Biodegradáveis Bioatividade Osteocondutividade	Fragilidade Baixa força (fratura muito) Difícil prever as taxas de degradação
	<i>Biovidros Vitrocerâmicos</i>	Silicato e borossilicato bioativo		
<i>Metais</i>	Titânio e suas ligas Tântalo Aço inoxidável Magnésio e suas ligas	Excelentes propriedades mecânicas (alta força e ductilidade) Biocompatibilidade	Baixa aderência ao tecido Corrosão Risco de toxicidade devido a liberação de íons metálicos	
<i>Compósitos</i>	Revestimentos de Fosfatos de cálcio sobre metais HA-quitosana	Combinação das vantagens dos biocompósitos individuais	Combinação das desvantagens dos biocompósitos individuais	

Baseado em: Garcia-Gareta *et al.*, (2015)

**Tabela 1: Biomateriais naturais e sintéticos usados para regeneração óssea.** Cada linha descreve exemplos, vantagens e desvantagens da aplicação de um biomaterial.

### 1.3 Aplicações de biomateriais tridimensionais na regeneração óssea

A utilização de biomateriais tem sido bastante explorada pela engenharia de tecidos, especialmente associados a elementos como: moléculas de sinalização (fatores de crescimento), células (progenitoras, pluri e multipotentes) e compósitos diversos (Romagnoli *et al.*, 2013).

Muito da compreensão da interação de células e biomateriais foi estabelecida em estudos utilizando modelos de scaffolds bidimensionais (2D) (Wozniak *et al.*, 2004; Stevens and George 2005). No corpo, no entanto, as células são rodeadas por matriz extracelular (MEC) e interagem com essa rede tridimensional estruturada, favorecendo eventos como a adesão, migração e diferenciação celular. Assim, o conhecimento sobre as interações célula-biomaterial em modelos 2D pode não ser aplicável para prever o comportamento celular no ambiente fisiológico tridimensional. De fato, estudos recentes têm demonstrado que as interações célula-matriz no corpo são significativamente diferentes daqueles estudos realizados em scaffolds 2D (Guillame-Gentil *et al.*, 2010). Uma característica importante a respeito de biomateriais tridimensionais é o fato de apresentarem porosidade, a qual permite o crescimento das células no interior do scaffold, o transporte de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento (Karageorgiou and Kaplan 2005; Seitz *et al.*, 2005). Mediante a importância da arquitetura 3D para simular o ambiente *in vivo*, alguns hidrogéis, como matrigel, polietilenoglicol, quitosana e o colágeno têm sido muito utilizados para estudar as interações e comportamentos celulares *in vitro* (Zaman *et al.*, 2006; Benoit *et al.*, 2008; Arakawa *et al.*, 2014).

Particularmente, o colágeno compreende 25% do seu peso seco de proteína total *in vivo*. Dentre os vários tipos de colágenos, o tipo I é o maior componente orgânico da matriz extracelular do osso e, devido à facilidade de extração e adaptabilidade para múltiplas aplicações, é a forma mais prevalente e popular para engenharia tecidual (Antoine *et al.*, 2014).

Numerosos estudos têm demonstrado o papel de matrizes à base de colágeno I na diferenciação e mineralização de osteoblastos (Casser-Bette *et al.*, 1990; Kinoshita *et al.*, 1999; Salgado *et al.*, 2015). Especificamente, o colágeno I suporta a diferenciação de células osteoprogenitoras, contém motivos de ligação (RGD, sequência de peptídeos arginina – glicina – ácido aspártico) para outras moléculas da MEC, por exemplo, a fibronectina, e é facilmente degradado por collagenases secretadas por células residentes (Di Lullo *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2013). Para potencializar as propriedades osteogênicas do colágeno I, várias pesquisas têm associado a esse polímero os cimentos à base de fosfato de cálcio, tais como a hidroxiapatita, devido à similaridade desse cimento com os minerais do osso (Akkouch *et al.*, 2011; Yunoki *et al.*, 2011).

Como já mencionado, uma característica importante de um biomaterial é o tempo de absorção/degradação, o qual deve apresentar aceleração de degradação ajustada com a regeneração. Nesse sentido, Marcacci et al. (2007) avaliaram o padrão de degradação de scaffold poroso de hidroxiapatita puro associado com células tronco da medula óssea em pacientes com perda óssea grave e histórico de cirurgias sem sucesso. Após 6-7 anos de implantação do scaffold, os resultados apresentaram boa integração do implante ao tecido hospedeiro, mas o biomaterial ainda não havia sido totalmente degradado (Marcacci *et al.*, 2007). Em contraste, um compósito à base de colágeno I associado à hidroxiapatita implantado em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos apresentou taxas de degradação em aproximadamente três semanas (Villa *et al.*, 2014).

Assim, as associações dos cimentos à base de fosfato de cálcio (hidroxiapatita sintética) com o colágeno I têm apresentado resultados biológicos promissores *in vitro* e *in vivo*, devido à boa compatibilidade, osteocondutividade, reduzidas taxas de degradação e capacidade de regeneração óssea (Peng *et al.*, 2009; Yunoki *et al.*, 2011). Estudo recente liderado por Salgado et al. (2015) associou nanopartículas de hidroxiapatita (nanoHA) ao colágeno I por meio da técnica de congelamento denominada criogel. Em particular, as nanoHA foram distribuídas homogeneamente na parede dos poros do scaffold de colágeno I e células humanas da medula óssea foram cultivadas. Os resultados biológicos demonstraram que, após 21 dias de cultivo celular, o biocompósito col I + nanoHA apresentou superfície e macroporos completamente cobertos por uma densa camada celular, enquanto o scaffold colágeno I puro (controle) apresentou uma menor porcentagem de cobertura celular. Adicionalmente, a proliferação celular aumentou entre 10 e 20% em biocompósitos col I + nanoHA, quando comparados ao controle. A expressão de moléculas osteogênicas, tais como Runx-2, osteocalcina, osteoprogesterina e fosfatase alcalina, também foi dosada e os resultados mostraram aumento na expressão de RNA mensageiro, o que sugere que a presença de nanoHA aumenta a diferenciação osteogênica de células tronco humanas da medula óssea (Salgado *et al.*, 2015).

Xia et al. (2013) desenvolveram um scaffold *lamelar* à base de colágeno I associado a cristais de apatita, o qual mimetiza de forma muito real a estrutura do osso natural quanto às orientações das fibras colágenas e distribuição dos cristais de apatita. Os resultados *in vitro* demonstraram a compatibilidade e a capacidade osteocondutiva do biomaterial e os testes *in vivo* mostraram que o biomaterial foi capaz de reparar o defeito de calvária de ratos em quatro semanas. Ainda, o teor da apatita aumentado no biomaterial potencializou a formação óssea quando comparado aos biomateriais com baixos teores dos cristais (Xia *et al.*, 2013).

Atualmente, outra classe de material bastante explorada no ramo da odontologia é o Agregado Trióxido de Mineral (MTA). Embora o MTA seja utilizado principalmente para terapia endodôntica, também têm sido relatadas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras (Maeda *et*

*al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). Uma hipótese desta tese é que partículas de MTA distribuídas em scaffolds de colágeno possam atuar como sítios de nucleação para formação de um novo osso de maneira similar como visto pela hidroxiapatita. Entretanto, como já mencionado, o colágeno I apresenta baixa resistência mecânica. Assim, outra hipótese desta tese é que o biocompósito à base de colágeno I e MTA possa ser melhorado pela adição de nanoestruturas que apresentem boas características mecânicas. Nesta tese, investigamos a viabilidade de utilizar nanotubos de carbono (NTC) para esse fim. No restante desta seção, descrevemos em detalhes a literatura relevante relacionada ao MTA e NTC.

### **1.3.1 Agregado trióxido de mineral**

O agregado trióxido de mineral (MTA) (do inglês *mineral trioxide aggregate*) é um material que foi desenvolvido para aplicações endodônticas, uma especialidade da odontologia no início dos anos 90 (Lee *et al.*, 1993) e aprovado para uso na endodontia pelo FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos em 1998. O desenvolvimento do MTA foi um marco para a odontologia, tendo sido utilizado em diferentes aplicações na endodontia (Naik *et al.*, 2014).

O MTA é uma mistura refinada do cimento Portland e óxido bismuto. Ele contém silicato de dicálcio, silicato de tricálcio, aluminato tricálcio e aluminoferrite de tetracálcio. Além desses componentes, foi observado que o MTA contém pequenas quantidades de outros minerais, tais como: dióxido de silício, dióxido de cálcio, óxido de magnésio, sulfato de potássio e sódio, os quais modificam suas propriedades físicas (Torabinejad *et al.*, 1995; Sarkar *et al.*, 2005). Uma característica importante desse cimento é o fato de apresentar propriedade antimicrobiana devido ao elevado pH de 12.5, semelhante ao hidróxido de cálcio (Torabinejad *et al.*, 1995).

As aplicações clínicas do MTA na endodontia são bastante diversificadas, como selamento de retro-obturação, apicificação, capeamento pulpar, pulpotomia para dentes primários, formação de barreira apical para dentes com polpas necróticas e outros procedimentos. A amplitude na terapia endodôntica se deve principalmente pela capacidade do MTA de induzir a formação de tecido mineralizado (Parirokh and Torabinejad 2010). Outras aplicações do MTA também merecem destaque. A regeneração do periodonto é um grande desafio para o campo da periodontia, pois a cementogênese é um evento crítico para a regeneração de tecidos periodontais. No entanto, o MTA exibiu resultados positivos em procedimentos periodontais, permitindo a restauração e crescimento do cimento, facilitando a regeneração de tecidos periodontais (Torabinejad *et al.*, 1995; Torabinejad *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2014).

Os efeitos sobre a sobrevivência, mineralização e expressão de genes relacionados com a mineralização de cementoblastos foram investigados por Hakki et al (2009). Os resultados desse estudo mostraram que o MTA não apresentou efeito negativo sobre a viabilidade e morfologia de cementoblastos, além de ocasionar o aumento do RNA mensageiro da sialoproteína óssea (BSP, do inglês *bone sialoprotein*) e colágeno do tipo I (Hakki *et al.*, 2009). Pesquisas com células humanas investigaram a resposta biológica em osteoblastos humanos cultivados com o MTA. Os resultados mostraram aumento da produção de osteocalcina e níveis elevados de fosfatase alcalina (Koh *et al.*, 1997). Estudos recentes demonstraram que o MTA promove a diferenciação odonto/osteogênica de células tronco da polpa dental via ativação do fator nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B), indicando que o MTA pode reparar polpas com pulpites em estágios iniciais (Wang *et al.*, 2014).

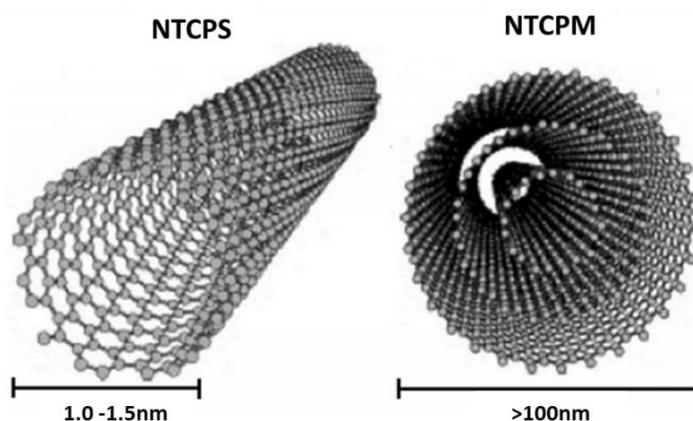
Como relatado, o MTA apresenta inúmeras qualidades como material bioativo e é capaz de criar um ambiente ideal para a cicatrização, podendo induzir a formação do tecido ósseo (Baek *et al.*, 2005; Parirokh and Torabinejad 2010). Ao entrar em contato com os tecidos humanos, o MTA parece atuar da seguinte maneira: lança íons de cálcio e facilita a adesão e proliferação celular; cria ambiente microbiano devido ao seu pH alcalino; modula a produção de citocina pró-inflamatória, como IL-6; induz a diferenciação e migração de células osteogênicas; proporciona o selamento biológico devido às formas de hidroxiapatita presentes em sua superfície (Parirokh and Torabinejad 2010; Corral Nunez *et al.*, 2014). Além dessas vantagens, o MTA é não mutagênico, não neurotóxico, e não produz quaisquer efeitos adversos sobre a microcirculação no tecido conjuntivo (Torabinejad and Parirokh 2010). No entanto, algumas limitações importantes quanto às propriedades do MTA na aplicação clínica têm sido discutidas, como difícil manuseio, endurecimento na presença de umidade e perda da sua coesividade. Pesquisas recentes têm misturado esse cimento a agentes estabilizadores, como quitosana ou gelatina, os quais têm sido usados como pastas para enxerto ósseo injetável. Esses estudos sugerem que a incorporação de MTA a scaffolds biomiméticos tridimensionais pode produzir um biocompósito que é osteocondutor e osteoindutor, promovendo assim uma regeneração óssea mais rápida (Ding *et al.*, 2010).

### **1.3.2 Nanotubos de carbono**

Os nanotubos de carbono (NTCs) estão entre os mais duros e fortes materiais conhecidos na área de engenharia de materiais. Os estudos com esse material iniciaram-se em 1991, liderados por Sumio Iijima, que denominou a sua preparação de tamanho nanométrico como “agulhas” de carbono, agora conhecidas como nanotubos. As aplicações utilizando nanotubos são ilimitadas, visto que podem ser empregados desde a aplicação em circuitos microeletrônicos e áreas da microscopia, até

em sistemas biológicos (Iijima 1991). O método mais comum de síntese dos NTCs é por deposição de vapor químico. Esse processo envolve a reação de um catalizador de metal com um hidrocarboneto não processado a altas temperaturas ( $> 700^{\circ}\text{C}$ ). Dependendo das condições de reação, pode-se criar uma variedade de comprimentos (nanômetros a milímetros) e larguras (1 a 100 nm) de NTCs (Martins-Junior *et al.*, 2013).

Os NTCs são caracterizados pela configuração de uma ou mais folhas de grafeno enroladas, sendo aqueles que possuem uma única folha enrolada classificados como nanotubos de parede simples, NTCPSs ou SWNTs (do inglês *single-walled carbon nanotubes*). Os NTCPSs possuem tipicamente diâmetros de 1,0 nm a 1,5 nm, com comprimentos de centenas e até dezenas de vezes maiores que seu diâmetro (Ajayan 1999). Os NTCs que possuem mais folhas de grafeno são classificados como nanotubos de paredes múltiplas, NTCPMs ou MWCNTs (do inglês *multi-walled carbon nanotube*). Devido a sua estrutura de múltiplas folhas, os NTCPMs possuem largos diâmetros, podendo ser superiores a 100 nm, sendo a distância entre as folhas de aproximadamente 0,34 nm (Tran *et al.*, 2009). A densidade dos NTCs é similar ao grafite e mais baixa que a de materiais metálicos utilizados na engenharia de tecidos, como aço e titânio (Zanello *et al.*, 2006). O NTCPM e o NTCPS têm propriedades semelhantes. No entanto, devido a sua natureza de múltiplas paredes, as paredes externas dos NTCPMs podem proteger as paredes internas de interações químicas com substâncias externas, além de apresentar propriedades de alta resistência e alta pureza, características não observadas totalmente ou parcialmente nos NTCPSs (Eatemadi *et al.*, 2014). Assim, nesta tese, optamos por associar os NTCPMs ao biomaterial proposto. A Figura 2 mostra os NTCs do tipo NTCPS e NTCPM.



Fonte: Martins-Junior *et al.*, (2013)

**Figura 2: Representação esquemática de NTCs.** NTCPS, diâmetro de 1,0 a 1,5 nm; (B) NTCPM, diâmetro  $>100$  nm.

Medições experimentais e teóricas mostraram que os NTCs exibem o maior módulo de Young (módulo de elasticidade) e resistência à tração entre os materiais conhecidos. Seu alto grau de flexibilidade está relacionado à força de atração entre os átomos de carbono e à ligação química covalente (Tonelli *et al.*, 2012). Essa análise experimental e teórica dos NTCs permite inferir que essas nanoestruturas podem sustentar 15 % do esforço de tensão de um osso, e sua implantação dentro da fratura pode melhorar as propriedades mecânicas do osso (Zanello *et al.*, 2006). Especialmente, a ausência de ligações oscilantes confere aos NTCs a inércia química para aplicações em sistemas biológicos. Essa inércia é devida à baixa dispersão dos NTCs em água ou solventes orgânicos, o que pode dificultar a interação com outros materiais, tais como polímeros. No entanto, avanços nas pesquisas de funcionalização dos NTCs, isto é, a associação com moléculas químicas diferentes, têm contornado essas limitações (Bhattacharyya *et al.*, 2008).

A fase reforçada dos NTCs pode aumentar não só as propriedades mecânicas, mas também a condutividade elétrica e termal de biocompósitos. A associação de NTCs a componentes cerâmicos como a hidroxiapatita também tem apresentado resultados relevantes para a engenharia tecidual. As análises da maioria dos estudos publicados sugerem que a utilização de NTCs melhora a biocompatibilidade, propriedades mecânicas do biomaterial, diferenciação/proliferação celular e a deposição de tecido ósseo (Martins-Junior *et al.*, 2013). Neste contexto, Yadav *et al.* (2010) demonstraram que a associação de cristais de hidroxiapatita com NTCPMs apresentou melhoria nas propriedades mecânicas do compósito, além de extensa nucleação de hidroxiapatita sobre os NTCs e ordenado entrelaçado mecânico entre os constituintes. Adicionalmente, os resultados toxicológicos dos testes *in vivo* demonstraram baixa toxicidade em baixas concentrações de NTCs e nenhuma rejeição imunológica aparente (Yadav *et al.*, 2010).

Adicionalmente, materiais biodegradáveis tiveram suas propriedades físico-químicas melhoradas após a associação com NTCs (Gupta *et al.*, 2013). Um estudo pioneiro sobre um compósito à base de colágeno I associado a NTCPs foi realizado por MacDonald *et al.* (2005). Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstraram que as moléculas de NTCPs se intercalam e se misturam entre as fibrilas de colágeno, observando uma forte interação entre essas duas classes de moléculas. Além disso, esse estudo mostrou que a combinação de NTCPs com o colágeno I não afetou a compactação do gel, assim como a viabilidade ou a proliferação celular (MacDonald *et al.*, 2005). Assim, o interesse na criação de scaffolds a partir da combinação de NTCs com biopolímeros que apresentem potencial na regeneração óssea tem crescido nos últimos anos. Sá *et al.* (2013) avaliaram a associação de NTCPs com hialuronato de sódio em alvéolos dentários de ratos diabéticos após exodontia. Esse modelo animal é importante por retratar uma doença metabólica que causa redução na formação óssea. Os resultados demonstraram que, após quatorze

dias, o tratamento com o biocompósito foi capaz de aumentar a formação de osso trabecular e reduzir o número de núcleos celulares, alcançando valores similares aos ratos não diabéticos (Sa *et al.*, 2013).

A influência da formação óssea ectópica foi avaliada em um compósito à base de colágeno I associado à NTCPM e proteína óssea morfogenética recombinante humana (rhBMP-2) aplicado em musculatura dorsal de ratos. Os resultados demonstraram que, após duas semanas, o conteúdo de osso neoformado foi significativamente maior no scaffold Col I + NTCPM + rhBMP-2 quando comparado ao scaffold controle, que não continha NTCPM. Análises histológicas no grupo com NTCPM mostraram que a ossificação endocondral progrediu de forma semelhante àquela do grupo de controle (Usui *et al.*, 2008). A apresentação dessas observações viabiliza a criação de compósitos à base de colágeno-NTC para a utilização como suportes na engenharia tecidual, assim como em outras aplicações biomédicas.

Dadas as propriedades de resistência estruturais e mecânicas oferecidas pelo colágeno tipo I e NTCPM, pode-se prever que a associação desses materiais com MTA pode resultar em um biocompósito que possui qualidades miméticas para a formação óssea e ser de grande utilidade na engenharia do tecido ósseo.

## 2. Justificativa

A partir da abordagem literária, temos o conceito de que a formação de um novo biocompósito à base de gel de colágeno I, MTA e NTC poderia gerar um novo produto para diversas aplicações clínico-médico-odontológicas. O biocompósito em questão teria como particularidade o fato de apresentar um teor de componente (MTA) que induz a deposição de material inorgânico (a apatita) e um teor de componente orgânico (gel de colágeno I) similares aos encontrados no osso humano, no qual o componente orgânico corresponde a diversas proteínas, majoritariamente o colágeno I. Os nanotubos de carbono seriam adicionados com a finalidade de melhorar a estruturação do gel e a resistência mecânica do biocompósito. Além de apresentar boas propriedades biológicas, o biocompósito seria de fácil manipulação e inserção, uma vez que, ao ser preparado na forma de um gel, poderia ser manipulado e fracionado em um eventual implante ou para a realização de preenchimento de defeito ósseo.

O gel, enquanto intumescido em solução de fluido corpóreo associado ao MTA e NTCPM, seria capaz de atuar como matriz temporária para auxiliar na proliferação celular e na deposição da matriz óssea e posteriormente para a troca progressiva do biomaterial por uma estrutura regenerada e reconstituída.

Poucos grupos da comunidade científica mundial estão pesquisando a biocompatibilidade dos NTCs, especialmente no formato de biocompósito. Assim, acreditamos que dispomos de um material com enorme potencial para o desenvolvimento de pesquisas diversas. Acreditamos que a partir deste estudo, novas metodologias e estudos mais específicos poderão ser desenvolvidos.

### 3. Objetivos

O objetivo principal deste estudo é gerar um biocompósito à base de colágeno I, MTA e NTCPMs. Por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* do biocompósito, poderemos analisar uma possível aplicação clínica desse scaffold. Para atingir esse objetivo primário, traçamos os seguintes objetivos específicos:

1. Analisar o padrão de distribuição do MTA e NTCPMs entre as fibrilas de colágeno nas diferentes combinações dos biocompósitos, assim como a interação de osteoblastos em cultivo.
2. Analisar as ultraestruturas celulares de osteoblastos em cultivo com os biocompósitos.
3. Avaliar a biocompatibilidade do biocompósito por meio de estudos *in vitro* utilizando osteoblastos imortalizados, MC3T3-E1. Essa avaliação inclui ensaios de citotoxicidade, migração celular e mineralização de osteoblastos cultivados sob diferentes combinações do biocompósito.
4. Avaliar, por meio de estudos *in vivo*, a biocompatibilidade do biocompósito em tíbias de ratos submetidas a defeito ósseo seguido por tratamento com o biocompósito.

## 4. Metodologia

### 4.1 Estudos *in vitro*

#### 4.1.1 Células

Neste estudo, foram utilizadas células da linhagem MC3T3-E1 subclone 14, pré-osteoblastos imortalizados da calvária de camundongos neonatos. Essas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Paulo Tambasco da USP - Ribeirão Preto, comercializadas pela empresa ATCC (Manassas, Virginia; [www.atcc.org](http://www.atcc.org)). A linhagem MC3T3-E1 é amplamente utilizada em estudos *in vitro* de diferenciação celular em osteoblastos, uma vez que essas células apresentam comportamento similar a osteoblastos primários de calvária. Sua morfologia é similar à de fibroblastos e são capazes de produzir matriz extracelular mineralizada quando cultivados em meio suplementado com ácido ascórbico. Para realização do cultivo, essas células foram retiradas do estoque de nitrogênio líquido e, então, descongeladas em banho de água a 37°C. A suspensão celular foi transferida para uma garrafa estéril de cultura de células (Jet Biofil, 75 cm<sup>2</sup>) contendo meio  $\alpha$ -MEM (*Alpha Minimum Essential Medium*) (Gibco™) suplementado com 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco™) e antibióticos estreptomicina (100 µg/ml) / penicilina (500 U/mL) (Invitrogen™) e incubada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 4 horas, o meio foi removido e renovado com meio fresco com a finalidade de desprezar células não viáveis e que não aderiram à superfície do frasco. Ao atingirem 80-90% de confluência, nos dias subsequentes, para a manutenção das células, foi realizada a passagem para outro frasco estéril (Jet Biofil, 75 cm<sup>2</sup>). Para realizar as passagens, o meio de cultura foi desprezado do frasco e a monocamada celular foi lavada com 5 mL de PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*) (Gibco™). Em seguida, foram adicionados 1 a 2 mL de solução de Tripsina (0,25%) Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) (Gibco™) por frasco, com a solução resultante incubada a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio completo fresco e transferidas para novos frascos na razão desejada (1:5, por exemplo). Utilizamos as células até a passagem 20, visto que osteoblastos em contínuas passagens apresentam diminuição na formação de matriz mineralizada (Yan *et al.*, 2013). Para o congelamento, as células apresentando 90-100% de confluência foram lavadas em PBS 1x e tripsinizadas, sendo posteriormente suspensas em meio de congelamento contendo 90% FBS em  $\alpha$ -MEM e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma – Aldrich ®). Um total de 1,5 ml da suspensão foram colocados em tubos de congelamento

(Corning ®), transferidos para freezer a -70°C por 48 horas e, posteriormente, estocados em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

#### **4.1.2 Preparação do gel de colágeno tipo I**

A obtenção do colágeno tipo I foi realizada a partir de caudas de ratos. As caudas foram lavadas três vezes em água e três vezes em álcool 70% e estocadas em freezer a -70°C, conforme descrito por (Kitten *et al.*, 1996). Em resumo, os tendões foram separados das caudas, lavados três vezes em água e, então, submersos e gentilmente misturados em ácido acético na concentração 0.5 mol/L por 48 hours a 4°C. Essa solução de colágeno solubilizada foi filtrada em um filtro de gaze (composto por várias camadas de gaze) para remoção de restos de tecidos e vasos sanguíneos, sendo posteriormente centrifugada na rotação de 14.000 g por 1 hora. O sobrenadante foi coletado e dialisado por três vezes em ácido acético (0,02 mol/L) a 4°C por um período de 3 dias. A concentração da solução de colágeno estoque utilizada neste estudo foi de 5,4 mg/mL e contém > 99% de colágeno tipo I, sendo acondicionada em geladeira a 4 – 7°C ao final da preparação.

#### **4.1.3 Síntese dos nanotubos de carbono**

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) foram sintetizados através de deposição química utilizando ferro e cobalto suportado em óxido de magnésio como catalizadores e o etileno como precursor de carbono a uma temperatura de 750°C (Trigueiro *et al.*, 2007). Foram utilizados neste estudo NTCPMs gentilmente cedidos pelo Prof. Luís Orlando Ladeira – UFMG. Os NTCPMs foram purificados e submetidos a tratamento em ácido nítrico (3 mol/L) em micro-ondas por 15 minutos. Nessa etapa, denominada carboxilação, ocorrem ligações covalentes de grupos carboxílicos (COOH) aos NTCPMs, resultando em uma melhora da solubilidade dos nanotubos em meios aquosos. Em seguida, os NTCPMs foram centrifugados a 7.000 rpm e lavados em água deionizada para completa remoção de ácido nítrico. Ao final, a solução de NTCPM foi mantida em estufa aquecida a 60°C por um período de 12 horas para secagem (Silva *et al.*, 2010).

Para realizar os ensaios biológicos com cultura celular, os NTCPMs foram submetidos à esterilização por raios gama no Laboratório de Radiação Gama - CDTN/UFMG. A dose de radiação utilizada foi de 2.5 Kgy, uma vez que estudos anteriores demonstraram que essa dose de radiação é capaz de esterilizar os NTCPM e não compromete suas atividades biológicas (Almeida 2013).

Foi preparada uma solução estoque de NTCPMs a uma concentração de 1,0 mg/mL, adicionando os NTCPMs sob forma de pó à água de injeção estéril. Em seguida, a solução foi

homogeneizada em vórtex e levada a um ultra-som por um período aproximado de 10 minutos, de modo a garantir a solubilidade total dos NTCPMs, sem a presença de grumos. A partir da solução estoque, foram preparados os biocompósitos, conforme descrição na Seção 4.5 deste capítulo. Foi utilizado o mesmo lote de NTCPMs em todas as preparações de biocompósitos.

#### **4.1.4 Agregado Trióxido de Mineral**

O Agregado Trióxido de Mineral (MTA) utilizado neste estudo é fabricado pela empresa *Angelus* de Londrina, PR, Brasil. O MTA tem coloração branca e é comercializado em embalagem individualizada contendo 0,14 g do cimento odontológico. A composição química do MTA listada na bula é: SiO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>O, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SO<sub>3</sub>, CaO, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO, resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio, sulfatos de potássio e sódio.

O preparo do MTA ocorreu inicialmente por diluição do pó de MTA em água de injeção esterilizada a uma concentração final de 10 mg/mL e, após a mistura, a solução foi homogeneizada em vórtex. A partir dessa solução estoque, foi preparada uma solução de uso, que recebeu ajuste de pH para 8,0, utilizando HCl 37%. É importante ajustar o pH da solução de uso para uma taxa aproximada do neutro a fim de permitir uma melhor dispersão dos componentes do MTA no gel de colágeno.

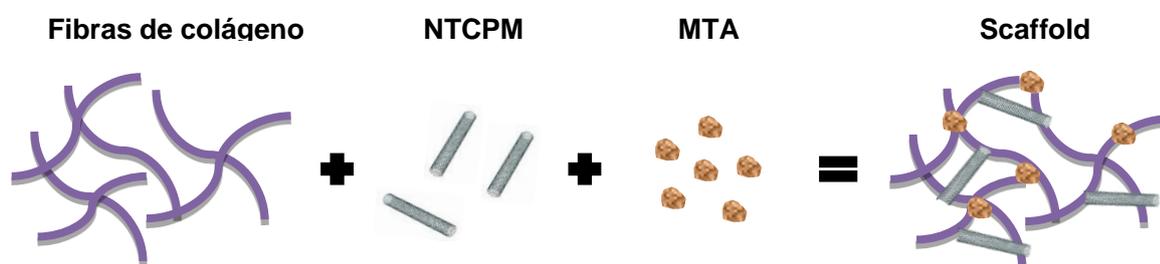
#### **4.1.5 Preparo do biocompósito**

A partir da solução estoque de colágeno I (5,4 mg/mL), foram preparados os biocompósitos associados ao MTA e/ou NTCPMs. Para preparar o biocompósitos, foram realizadas misturas com as seguintes substâncias: meio de cultura  $\alpha$ -MEM (não suplementado) 10x concentrado (10% do volume total), água milli-Q estéril (até completar o volume desejado), hidróxido de sódio (NaOH) (4% do volume da solução de colágeno I), MTA e/ou NTCPMs (nas proporções definidas para este estudo). A mistura do MTA e NTCPMs ocorreu sempre antecipada ao colágeno, pois assim era garantida uma dispersão homogênea tanto dos minerais do MTA quanto dos NTCPMs na solução inicial. A mistura foi homogeneizada em vórtex e novamente acondicionada rapidamente em gelo para adição de colágeno ao final.

O meio de cultura 10x concentrado eleva o teor de sal na solução e, então, necessita-se ajustar o pH para neutro, utilizando a solução de NaOH. Nessa faixa de pH, as moléculas de colágeno se reassociam em fibrilas alongadas com forma estável, estabelecendo ao final do preparo um gel de colágeno tridimensional. Em todas as etapas, as soluções e os tubos plásticos foram mantidos em

gelo até o fim do preparo, uma vez que a elevação da temperatura contribui para a gelificação dos biocompósitos à base de colágeno I.

Assim que a mistura foi finalizada, prosseguimos com a homogeneização em vórtex sob baixa rotação, a fim de evitar bolhas, e seguimos com o plaqueamento da solução, que foi mantida, a partir desse momento, à temperatura ambiente. Após a gelificação dos biocompósitos, prosseguimos com a lavagem (1x – 10 min) com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado, ou seja, sem soro e sem antibiótico. O objetivo da lavagem é equilibrar o pH do gel e retirar o excesso de sal que pode comprometer as atividades celulares. É importante ressaltar que as concentrações de MTA e NTCPMs foram calculadas a partir do valor da massa de colágeno I presente na amostra e são expressos em porcentagem. A Figura 3 apresenta o esquema do arranjo do biocompósito.



**Figura 3: Esquema do arranjo do biocompósito.** Fibrilas de colágeno são associadas ao NTCPM e ao MTA, originando um novo biocompósito.

#### 4.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os biocompósitos foram preparados e distribuídos em placas de 35mm de diâmetro (Jet Biofil). Após ocorrer a gelificação, as amostras foram lavadas uma vez com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado por um período de 10 minutos. Em seguida foram plaqueadas  $2,8 \times 10^4$  células na superfície dos biocompósitos e mantidas com meio  $\alpha$ -MEM suplementado em incubadora de  $\text{CO}_2$  por um período de 7 dias. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Os biocompósitos para MEV foram preparados conforme combinações apresentadas na Tabela 2

	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA (%)	NTCPM (%)
MEV	I	1,5 / <u>1,75</u> / 2,0 / 2,5	_____	_____
	II	1,75	1,6 / 3,2 / 6,4 / 12,8	_____
	III	1,75	_____	0,6 / 1,2 / 2,4 / 6,0
	IV	1,75	3,2	1,2
	V	1,75	6,4	6,0

**Tabela 2: Delineamento dos cinco grupos experimentais avaliados por MEV.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e para cada associação são listados valores de concentração e/ou % testados. A concentração de colágeno I selecionada experimentalmente aparece sublinhada e foi fixada nas demais combinações do biocompósito.

Após a finalização do ensaio, as placas contendo as amostras foram processadas como descrito abaixo:

**Lavagem:** Meio  $\alpha$ -MEM não suplementado aquecido a 37°C - 2 x de 5 minutos cada.

**Fixação primária:** Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 5%) preparado em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora.

**Lavagem:** Tampão cacodilato 0,1M (cacodilato de sódio) - 3 x de 10 minutos cada.

**Fixação secundária:** Tetróxido de ósmio 1% preparado em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora.

**Lavagem:** Água destilada por 3 x de 10 minutos cada.

**Fixação secundária:** Tetróxido de ósmio 1% preparado em água destilada por 1 hora.

**Lavagem:** Água destilada - 3 x de 10 minutos cada.

**Desidratação:** As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool como descrito abaixo.

- Álcool 30% - 1 x de 10 minutos
- Álcool 50% e 70% - 2x de 10 minutos para cada álcool
- Álcool 80% e 95% - 2x de 10 minutos para cada álcool
- Álcool 100% - 3 x de 10 minutos

**Recortes:** As amostras foram recortadas com auxílio de navalha e pinça em retângulos de aproximadamente 10 mm x 5 mm.

**Secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>:** Os cortes das amostras passaram por secagem em câmara de ponto crítico (Balzers modelo CPD-020), do CAPI - ICB/UFMG.

**Metalização:** As amostras foram metalizadas no metalizador Edwards Scancoat Six do Laboratório de Microanálise do Departamento de Física do ICEX/UFMG. A metalização de ouro ocorreu em

corrente de aproximadamente 50 mA, a uma distância do material ao target próxima de 30 mm durante um período de 60 segundos. Assim, a espessura de ouro depositada sobre as amostras foi de aproximadamente 18,75 nm.

Posteriormente à metalização, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura Zeiss - DSM 950 no CAPI – ICB/ UFMG.

#### 4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os biocompósitos preparados para a MET continham células distribuídas aleatoriamente nas três dimensões da amostra. Para isso, as células foram misturadas ao biocompósito ainda no estado líquido. O delineamento dos grupos experimentais está listado na Tabela 3.

	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA (%)	NTCPM (%)
MET	I	1,75	_____	_____
	II	1,75	6,4	_____
	III	1,75	_____	6,0

**Tabela 3: Delineamento dos três grupos experimentais avaliados por MET.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e para cada associação são listados valores de concentração e/ou % testados.

Inicialmente, foram preparadas pré-soluções do biocompósito (conforme grupos estipulados na Tabela 3) até a adição de MTA ou NTCPMs, ou seja, essas soluções continham meio de cultura  $\alpha$ -MEM 10x concentrado (10% do volume total), água milli-Q estéril, NaOH (4% do volume da solução de colágeno I) e MTA (6,4 %) ou NTCPMs (6,0 %). As pré-soluções dos biocompósitos foram homogeneizadas em vórtex e armazenadas em gelo durante todo o preparo e, posteriormente, mantidas no gelo em repouso. Em seguida, uma densidade de  $1 \times 10^6$  células MC3T3-E1 por placa foi centrifugada a uma rotação de 2,000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, foi descartado o meio sobrenadante do tubo e o pellet contendo os osteoblastos foi suspenso nas pré-soluções, tomando o cuidado de homogeneizar sem formar bolhas. Posteriormente, foi adicionado o colágeno I e homogeneizado em vórtex sob baixa rotação. Em seguida, os biocompósitos contendo as células foram plaqueados em placas de 35 mm de diâmetro (Jet Biofil) e deixados em repouso até ocorrer a gelificação, que em média ocorreu em 10 minutos. Posteriormente, as amostras gelificadas foram

lavadas com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado por 10 minutos e, em seguida, foi adicionado meio  $\alpha$ -MEM suplementado. As amostras foram mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> por 14 dias, sendo que o meio foi trocado a cada 2 dias. Finalizado o período do ensaio, as placas contendo as amostras foram processadas como descrito abaixo:

**Lavagem:** Meio  $\alpha$ -MEM não suplementado aquecido a 37°C - 2 x de 5 minutos cada.

**Fixação primária:** Karnovsky preparado em tampão cacodilato 0,1M – 1h30min, sendo que foi realizada uma troca do fixador ao final de 45 min.

**Lavagem:** Água destilada por 3 x de 10 minutos cada.

**Fixação secundária:** Tetróxido de ósmio reduzido por ferrocianeto de potássio a 3% por 2h, com as amostras protegidas da luz.

**Lavagem:** Solução fisiológica de NaCl 0,9% com 17,8% de sacarose - 5 x de 10 minutos cada.

Adicionado acetato de uranila 2% em solução aquosa de sacarose 13,3% overnight.

**Desidratação:** As amostras foram desidratadas com álcool e óxido de propileno como descrito abaixo:

- Álcool 35% - 2 x de 10 minutos
- Álcool 50% - 2x de 10 minutos
- Álcool 70% - 2x de 10 minutos
- Álcool 85% - 2 x de 10 minutos
- Álcool 95% - 2 x de 10 minutos
- Álcool 100% - 3 x de 10 minutos
- Óxido de propileno – 2 x de 20 minutos

**Recortes:** Os biocompósitos foram recortados com auxílio de navalha e pinça em quadrados de aproximadamente 4 mm.

**Infiltração:** As amostras foram infiltradas em óxido de propileno e resina Epon, nas proporções descritas abaixo:

- 2 volumes de óxido de propileno : 1 volume de Epon – 1h30 minutos
- 1 volume de óxido de propileno : 1 volume de Epon – 1h30 minutos
- 1 volume de óxido de propileno : 2 volumes de Epon – overnight

Posteriormente, as amostras foram distribuídas em moldes, acrescidas da resina Epon pura e, em seguida, mantidas em estufa aquecida a 45°C por 1h. Após esse tempo, as amostras foram levadas para estufa a 60°C por 48h.

**Cortes semi-finos:** Realizamos um corte em forma de pirâmide em todas as amostras para obtenção dos cortes semi-finos de espessura entre 0,5 a 1 $\mu$  de espessura, até delimitar a área desejada para o estudo. Os cortes nessa etapa tinham coloração violeta.

**Cortes ultra-finos:** Após delimitar a área de interesse, prosseguimos com os cortes ultra-finos utilizando um ultra-micrótomo. Os cortes continham espessura aproximada de 50 nm e apresentaram cor prata. Os cortes ultra-finos foram processados em forma de fitas e foram pescados em tela de cobre. Posteriormente, as amostras foram contrastadas com citrato de chumbo.

Após o processamento, as amostras foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 – Spirit Biotwin FEI - 120 Kv, no Centro de Microscopia - UFMG.

#### **4.1.8 Análise das propriedades mecânicas**

Os scaffolds atuam como potenciais materiais que mimetizam a morfologia estrutural e função do tecido alvo em questão. Nesta tese, os biocompósitos foram desenvolvidos para atuar como matrizes para a formação de tecido ósseo. Assim, torna-se essencialmente importante investigar a compatibilidade mecânica do scaffold com o tecido a ser implantado. Para isso, inicialmente conduzimos nossas análises por meio da técnica de microscopia de força atômica, técnica que permite analisar a superfície de polímeros com alta precisão e praticidade, uma vez que as amostras podem ser analisadas em estado sólido e líquido. No entanto, não foi possível realizar as imagens devido à porosidade das amostras, uma vez que a haste (cantilever) apresenta uma ponta muito fina e, sempre que essa ponta alcançava um poro, ela caía entre as fibrilas e se quebrava. Foram realizadas muitas tentativas no modo contato e não-contato com a superfície, tendo os testes nos dois modos se mostrado inviáveis. Esses testes foram realizados inicialmente no Centro de Microscopia da UFMG e posteriormente em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Mônica Cotta do Departamento de Física da UNICAMP.

Em sequência, optamos por realizar a análise reológica da amostra, a qual permite avaliar a viscosidade, plasticidade e elasticidade de determinados biomateriais, especialmente os hidrogéis. Os biocompósitos foram preparados em triplicata e analisados em estado gelificado em reômetro TA Universal. Os resultados demonstraram incompatibilidade entre as réplicas e baixa confiança nas análises. Foram repetidas três avaliações alterando-se as concentrações das amostras, mas os problemas não foram solucionados. Assim, tornou-se impossível realizar qualquer análise estatística dos resultados e optamos por focar nosso estudo nos ensaios biológicos. Essas análises reológicas foram realizadas em colaboração com a Prof<sup>a</sup> Marivalda Magalhães do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais – UFMG.

#### 4.1.9 Ensaio de viabilidade celular

As amostras foram preparadas inicialmente com o plaqueamento das células MC3T3-E1 sob a densidade de  $1,3 \times 10^4$  células por placa. Foram utilizadas placas de cultura individuais com vidro acoplado ao fundo do poço, apropriadas para os ensaios de fluorescência (FluoroDish / Ref. FD35-100), contendo os seguintes diâmetros: total da placa igual a 35 mm e fundo de vidro do poço igual a 23 mm. Todos os grupos experimentais foram preparados em triplicata. Para assegurar a adesão celular, as placas foram mantidas em incubadora a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> por 1h. Após esse tempo, foi retirado todo o meio de cultura das placas e adicionados 2,0 mL dos biocompósitos nas combinações apresentadas na Tabela 4.

Viabilidade celular	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA (%)	NTCPM (%)
	I	1,75 / <u>2,0</u> / 2,5	_____	_____
	II	2,0	1,6 / 3,2 / 6,4 / 12,8	_____
	III	2,0	_____	0,6 / 1,2 / 2,4 / 6,0
	IV	2,0	3,2	1,2

**Tabela 4: Delineamento dos grupos experimentais para o ensaio de viabilidade celular.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e para cada associação são listados valores de concentração e/ou % testados. A concentração de colágeno I selecionada experimentalmente aparece sublinhada e foi fixada nas demais combinações do biocompósito.

A gelificação dos biocompósitos ocorreu em 10 minutos e, em seguida, prosseguimos com uma lavagem com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado por 10 minutos. Após a lavagem, adicionamos meio  $\alpha$ -MEM suplementado e mantivemos as amostras em incubadora de CO<sub>2</sub> pelos períodos de 24 e 48 horas, períodos estabelecidos para análise da viabilidade celular. Posteriormente, iniciamos o protocolo do ensaio de viabilidade utilizando o kit reativo LIVE/DEAD® (Molecular Probes - Life Technologies), contendo calceína (AM) e homodímero de etídio (EthD-1). As amostras foram retiradas da incubadora e lavadas por 2 vezes de 5 minutos com meio  $\alpha$ -MEM completo. Em seguida, foram adicionados 700  $\mu$ L por placa de uma solução contendo 4  $\mu$ M de EthD-1 e 2  $\mu$ M de calceína diluídos em PBS 1x pH 7,2 - levemente aquecido. As amostras foram incubadas com a solução previamente preparada por um período de 45 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz, sob leve homogeneização em shaker. Prosseguimos com a microscopia de fluorescência utilizando dois canais nos seguintes comprimentos de onda (excitação/emissão): a faixa de 494 a 517

nm para a calceína e 528 a 617 nm para o EthD-1. As células viáveis foram marcadas por calceína AM, que apresenta fluorescência verde, devido à ação das esterases intracelulares, ativas somente em células viáveis. Por outro lado, devido à diminuição da atividade esterásica e ao aumento das alterações físicas e/ou bioquímicas da membrana celular, as células em apoptose apresentaram fraca marcação por calceína AM e progressiva marcação por EthD-1, que apresenta fluorescência vermelha. As células inviáveis, por sua vez, não foram marcadas por calceína AM, mas foram intensamente marcadas por EthD-1.

Foram registradas imagens aleatórias de aproximadamente 150 células por réplica com objetiva de 20X, utilizando microscópio Zeiss Axio Observer. As células foram contadas utilizando *software* ImageJ versão 1.42I e, após a contagem, foram divididas em dois grupos: células vivas (marcadas pela calceína) e células mortas (marcadas pelo EthD-1). Os resultados foram expressos em valores percentuais de células vivas como média  $\pm$  EP segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Bonferroni.

#### **4.1.10 Ensaio de proliferação celular**

As amostras foram preparadas inicialmente com o plaqueamento das células MC3T3-E1 sob as mesmas condições do ensaio de viabilidade, ou seja, densidade de  $1,3 \times 10^4$  células por placa (FluoroDish). Após esse tempo, foi retirado todo o meio de cultura das placas e adicionados 2,0 mL dos biocompósitos. As culturas ficaram em incubadora a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub> por 48h. Uma vez que os ensaios desta tese foram conduzidos com as células em cultivo em ambiente 3D, tornou-se inviável executar alguns ensaios pelos métodos tradicionais. Para a proliferação celular, decidimos utilizar uma metodologia que pudesse ser analisada por microscopia de fluorescência. Assim, optamos pelo produto Click-iT® EdU Alexa Fluor® 555 Imaging Kit - C10338, que é específico para microscopia de fluorescência e apresenta marcação somente das células que estão na fase S. No entanto, não tivemos sucesso na marcação das células com o kit. Uma possível explicação para esse problema pode ser o fato de que algumas moléculas dos reagentes não conseguem atravessar as fibrilas de colágeno e ficam de certa forma “presas”, impossibilitando as marcações.

#### **4.1.11 Ensaio de migração celular em 3 dimensões**

O ensaio de migração celular foi realizado nos biocompósitos listados na Tabela 5 desta seção e, para todos os grupos, foram preparadas amostras em triplicata. Inicialmente, foi estabelecida a concentração ótima de colágeno I e, posteriormente, prosseguimos com a combinação do MTA e/ou

NTCPM. Para facilitar a compreensão do delineamento experimental, listamos as diferentes configurações na Tabela 5.

Migração celular	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA (%)	NTCPM (%)
	I	1,5 / <u>1,75</u> / 2,0 / 2,5 / 3,0 / 3,5	_____	_____
	II	1,75	1,6 / 3,2 / 6,4 / 12,8	_____
	III	1,75	_____	0,6 / 1,2
	IV	1,75	3,2	1,2

**Tabela 5: Delineamento dos quatro grupos experimentais do ensaio de migração celular.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e, para cada associação, são listados valores de concentração e/ou porcentagem testados. A concentração de colágeno I selecionada experimentalmente aparece sublinhada e foi fixada nas demais combinações do biocompósito.

O objetivo principal do ensaio de migração celular nas diferentes combinações do biocompósito foi avaliar a capacidade migratória dos osteoblastos em ambiente tridimensional. Para isso, criamos um modelo de arcabouço dos biocompósitos em duas camadas, uma espécie de “sanduíche”, e denominamos as camadas de *base* e *tampa*. Os osteoblastos foram plaqueados no meio desse sistema, ou seja, entre as camadas. A *base* recebeu apenas colágeno I na concentração de 2,5 mg/mL e volume de 1,3 mL, padronizado para todos os grupos desse experimento. Já a *tampa* recebeu as diferentes combinações do biocompósito listadas na Tabela 5, sendo padronizado o mesmo volume de 1,3 mL de acordo com cada grupo estudado.

Foram utilizadas novamente as placas de cultura individualizadas de 35 mm de diâmetro com vidro acoplado ao fundo do poço (FluoroDish Ref. FD35-100). Após o preparo e completa gelificação da camada base de colágeno, prosseguimos com a lavagem utilizando meio  $\alpha$ -MEM não suplementado. Em seguida, as células MC3T3-E1 foram semeadas a uma densidade de  $1,5 \times 10^5$  células por placa. Nessa densidade celular, observamos que, ao término do período analisado, as células se encontram com confluência adequada para contagem dos núcleos celulares. Após o plaqueamento das células, as placas foram acondicionadas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 1 hora, tempo suficiente para ocorrer a adesão das células ao substrato de colágeno. Completado o tempo de adesão, o meio de cultura das células foi retirado e a camada *tampa* foi adicionada. A gelificação da *tampa* contendo o biocompósito ocorreu em aproximadamente 10 minutos e, posteriormente, foi lavada com meio de cultura não suplementado. Por último, foi adicionado 1,5 mL de meio  $\alpha$ -MEM suplementado e aquecido. As placas com as amostras foram

mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> por um período de 48 horas. Finalizado o período do ensaio, as amostras foram processadas como se segue:

**Lavagem das amostras:** Meio  $\alpha$ -MEM sem soro e antibiótico, aquecido a 37°C - 2 vezes de 5 minutos cada.

**Fixação:** Paraformaldeído 4% diluído em Tris-HCl 10 mM - 2 vezes de 45 min cada à temperatura ambiente (sob leve homogeneização em shaker).

**Lavagem das amostras:** Tampão Tris-HCl 10 mM - 3 vezes de 10 minutos cada.

**Marcação nuclear:** Incubação com DAPI 0.2  $\mu$ g/mL diluído em Tris-HCl 10 mM por 45 minutos, sob proteção da luz à temperatura ambiente.

**Lavagem das amostras:** Tampão Tris-HCl 10 mM - 3 vezes de 10 minutos cada, sob proteção da luz.

Realizamos microscopia de fluorescência utilizando canal com comprimentos de onda (excitação/emissão) na faixa de 345 a 460 nm para o DAPI. Foram obtidas imagens do meio do “sanduíche”, local onde se encontrava maior quantidade de células. Após registro de imagens, realizamos a contagem manual dos núcleos de células que migraram para o biocompósito, ou seja, para o topo da amostra. Foram registradas imagens aleatórias de três campos por réplica com objetiva de 10X, totalizando uma média de 500 células por campo, utilizando o microscópio Zeiss Axio Observer. As células foram contadas utilizando *software* ImageJ versão 1.42I e, após a contagem, foram divididas em dois grupos de análise: células que não migraram (e permaneceram no meio do “sanduíche”) e células que foram capazes de migrar (células presentes no topo do biocompósito). Os resultados foram expressos em valores percentuais de migração celular como média  $\pm$  EP segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Tukey.

#### **4.1.10 Análise da mineralização de osteoblastos em biocompósitos tridimensionais**

A avaliação de matriz mineralizada dos osteoblastos cultivados nos biocompósitos foi conduzida em ambiente tridimensional e, para todos os grupos, foram preparadas amostras em duplicata. A preparação do arcabouço tridimensional utilizado neste experimento está descrita na Seção 4.1.7, sendo que foram preparados biocompósitos em dupla camada lembrando um “sanduíche” e as células semeadas entre as camadas, ou seja, em ambiente tridimensional. Anteriormente ao ensaio de mineralização, foram realizados testes para avaliação de fosfatase alcalina no sobrenadante das células cultivadas nos biocompósitos (Kit fosfatase alcalina – Labtest

Ref.40). No entanto, não houve detecção de fosfatase alcalina nas amostras testadas após leitura em espectrofotômetro e, como as células foram plaqueadas no interior dos biocompósitos, não foi possível avaliar essa enzima por meio do sobrenadante. Portanto, como alternativa, decidimos avaliar a mineralização dos osteoblastos nos biocompósitos tridimensionais.

Para facilitar a compreensão do delineamento experimental, listamos as diferentes configurações na Tabela 6.

Mineralização	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA (%)	NTCPM (%)
	I	1,75	_____	_____
	II	1,75	1,6 / 3,2 / 6,4 / 12,8	_____
	III	1,75	_____	0,6 / 1,2 / 2,4 / 6,0
	IV	1,75	3,2	1,2

**Tabela 6: Delineamento dos quatro grupos experimentais da avaliação de matriz mineralizada.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e para cada associação são listados valores de concentração e/ou porcentagem testados.

As células MC3T3-E1 foram semeadas entre as duas camadas de biocompósitos a uma densidade de  $1,0 \times 10^5$  células por poço, sendo que, neste experimento, utilizamos placas de 6 wells (Jet Biofil). A partir do plaqueamento, as células receberam meio  $\alpha$ -MEM suplementado e acrescido de solução osteogênica (2,165 mg/mL de  $\beta$ -glicerofosfato + ácido ascórbico) (Sigma – Aldrich ®). As placas foram mantidas em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 21 dias, sendo que o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Ao final do experimento, as células foram lavadas com meio  $\alpha$ -MEM não suplementado aquecido a 37°C e, em seguida, fixadas por 45 minutos com paraformaldeído 4% também aquecido a 37°C e sob leve agitação. Após esse procedimento, os poços foram lavados com PBS 1x – 3 vezes de 10 minutos sob leve agitação em shaker. Em seguida, as amostras foram cobertas com Vermelho de Alizarina 20 mg/mL (Sigma – Aldrich ®) e as placas homogeneizadas sob agitação leve por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, todo o vermelho de Alizarina foi retirado e os poços foram lavados abundantemente com água deionizada por 20 vezes de 5 minutos cada. Após esse preparo, os poços foram fotografados com câmera fotográfica utilizando lente de aproximação, uma vez que somente a lente de uma câmera fotográfica foi capaz de capturar toda a área do poço em uma mesma imagem. Após o registro das imagens, prosseguimos com a demarcação das áreas de mineralização das imagens utilizando o *software* ImageJ versão 1.49. Para que ficasse precisa a demarcação dessas áreas, realizamos essas medidas

em um computador contendo uma mesa com caneta digitalizadora, a qual substitui o mouse tradicional, permitindo o desenho das áreas mineralizadas de forma mais precisa. Esse procedimento foi realizado no Núcleo em Estudos em Inflamação no Departamento de Morfologia – ICB/UFMG.

Após as demarcações, foram calculadas a área total do biocompósito (poço da placa) e as áreas de mineralização. Os resultados foram expressos em valores percentuais de área de mineralização como média  $\pm$  EP segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.

## **4.2 Estudos *in vivo***

### **4.2.1 Aplicação do biocompósito em defeito ósseo de tíbias de ratos**

Os estudos *in vivo* foram conduzidos com ratos Wistar machos, com idade média de 3 meses e peso variando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Este experimento foi aprovado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG e está documentado com protocolo nº 70/2013 (documento em anexo). As cirurgias de defeito ósseo nas tíbias dos ratos foram realizadas no Laboratório de Biologia Cardíaca do Departamento de Morfologia – ICB/UFMG.

Os animais foram mantidos em biotério adequado, com temperatura e luminosidade controladas, acondicionados em gaiolas plásticas, quatro animais por gaiola, e com acesso livre de água e ração. Como medida profilática, 48 horas antes da cirurgia, os animais receberam uma dose por via intramuscular do antibiótico benzilpenicilina/estreptomicina (0,84 mg/100 g de peso corporal) (Vital Farma). Para a realização da cirurgia, os animais foram submetidos a anestesia por via intramuscular de uma dose combinada de cloridrato de xilazina 2% (0,1 mL/100 g) e cloridrato de ketamina 10% (0,1 mL/100 g). Após a sedação dos animais, realizamos a tricotomia dos pelos e antissepsia da área cirúrgica com álcool iodado (Figura 4A). Posteriormente, na região ventral da pata esquerda, realizamos uma incisão no músculo tibial anterior no sentido longitudinal com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril (Figura 4B). Em seguida, com auxílio de uma espátula, afastamos a musculatura do periósteo e realizamos uma perfuração no osso tibial com broca de 1,6 mm de diâmetro sob baixa rotação, sendo realizada irrigação constante com solução de cloreto de sódio 0.9% - soro fisiológico, para evitar a necrose óssea térmica. Desse modo, o defeito ósseo nas tíbias dos ratos foi padronizado com um diâmetro de 1,6 mm. Finalizado o defeito, a região foi lavada com soro fisiológico de modo a certificar que não havia resíduos de osso em pó (Figuras 4C-E). Em

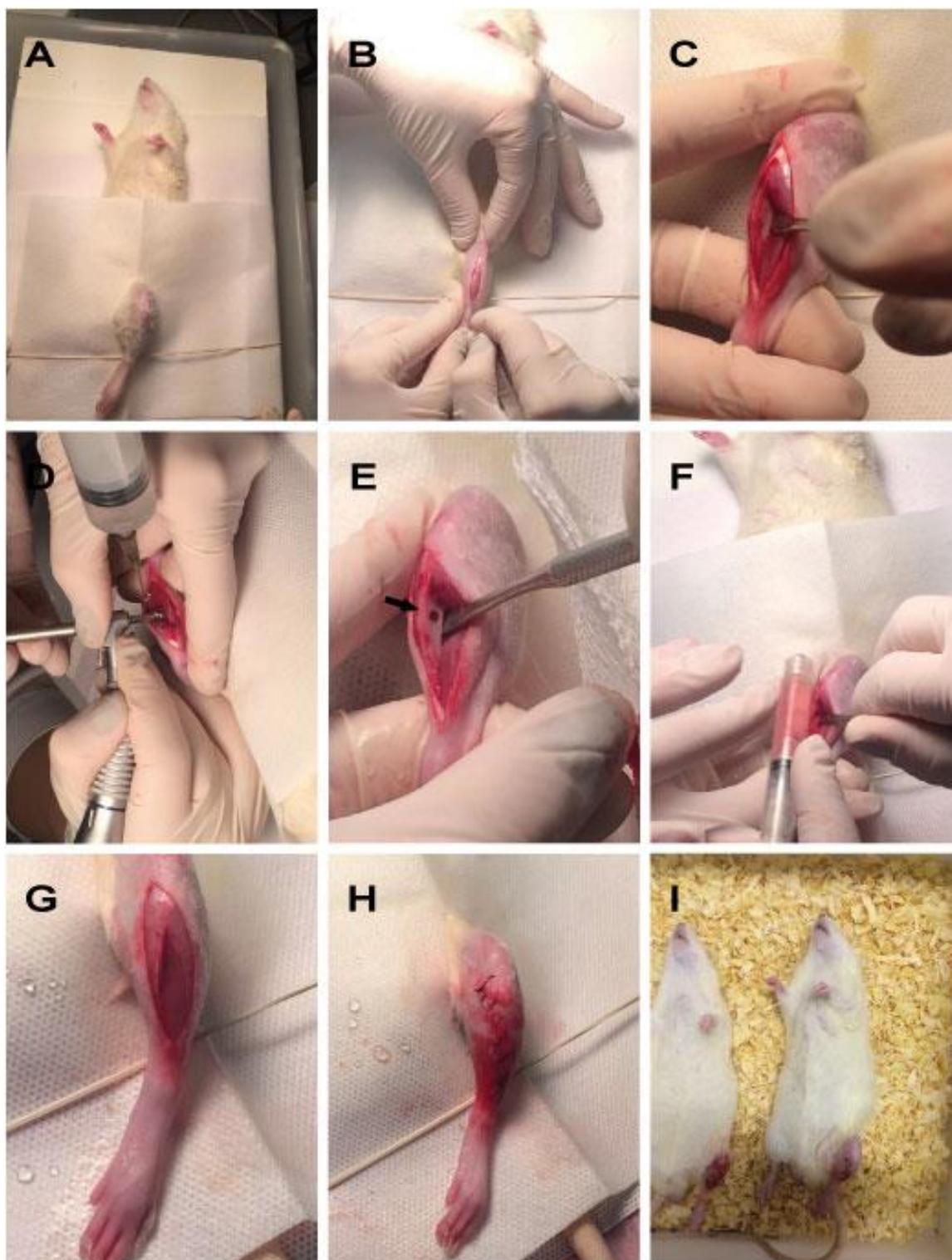
seguida, prosseguimos com a aplicação dos biocompósitos, que foi padronizada por injeção dos biocompósitos não-gelificados e utilizando seringa sem agulha (Figura 4F). O delineamento dos grupos experimentais está listado na Tabela 7.

	Grupos	Colágeno I (mg/mL)	MTA(%)	NTCPM (%)	Carbopol (mL)
<b>Experimento <i>in vivo</i></b>	<b>I</b>	1,0 / 1,5 / <u>2,0</u> / 2,5	_____	_____	_____
	<b>II</b>	2,0	1,6 / 3,2 / 6,4 / 12,8	_____	_____
	<b>III</b>	2,0	_____	0,6 / 1,2 / 2,4 / 6,0	_____
	<b>IV</b>	2,0	3,2	0,6	_____
	<b>V</b>	_____	3,2	_____	2 mL
	<b>VI</b>	_____	_____	0,6	2 mL

**Tabela 7: Delineamento dos grupos experimentais do estudo *in vivo*.** Cada linha da tabela acima apresenta uma configuração do biocompósito e, para cada associação, são listados valores de concentração, porcentagem ou volume testados.

Os tratamentos foram aplicados nos defeitos das tíbias de modo que toda a cavidade ficasse preenchida pelo biocompósito. Adicionalmente, um grupo experimental, o controle, não recebeu tratamento do biocompósito, sendo que avaliamos o efeito do coágulo sanguíneo na formação de trabéculas ósseas. Após a aplicação dos tratamentos, o músculo foi acomodado na sua posição natural e, em seguida, realizamos a sutura da pele (Figuras 4G-H). Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais receberam mais uma dose do antibiótico benzilpenicilina/estreptomicina (0,84mg/100g de peso corporal) e uma dose do anti-inflamatório Banamine (0,1mL/100g) (MSD/Saúde animal), ambos por via intramuscular.

Após 7 dias, os animais foram eutanasiados por decapitação e as tíbias foram imediatamente removidas e fixadas por imersão em formalina neutra tamponada 10% à temperatura ambiente por 48 horas. Essas tíbias foram analisadas por meio de microtomografia computadorizada e análise histológica.



**Figura 4: Procedimento cirúrgico de defeito ósseo em tíbia de ratos e aplicação de biocompósito.** (A) Tricotomia dos pelos; (B-C) Incisão no músculo tibial anterior e acesso à tíbia; (D) Realização do defeito ósseo com broca específica e irrigação da área com soro fisiológico; (E) Defeito ósseo; (F) Aplicação do biocompósito; (G-H) Acomodação do músculo e sutura; (I) Ratos em recuperação nas gaiolas.

#### 4.2.2 Microtomografia computadorizada

Após as cirurgias, as tíbias já fixadas em formalina neutra tamponada foram lavadas em água corrente e imergidas em solução de álcool 70% para armazenamento. Os ensaios de micro-CT foram realizados no Laboratório de Biomateriais do Departamento de Engenharia Metalúrgica - UFMG. Foi utilizado equipamento compacto modelo SkyScan 1174 (Bruker micro-CT, Bélgica). As amostras foram previamente secas para remoção do líquido superficial e alocadas diretamente no porta-amostras fornecido pelo fabricante, fixando-as de modo a não se movimentarem durante o escaneamento. Foram utilizados para o escaneamento uma tensão de 50 kV, corrente de 800 mA e 40 W de potência da fonte de Raios-X. Foi utilizada uma resolução espacial de 8,05  $\mu\text{m}$  de tamanho de pixel e filtro de alumínio de 0,5 mm. O escaneamento foi realizado em 180°, com projeções sendo obtidas a cada 0,7°, sendo 3 frames para cada passo de rotação. As projeções de imagens foram reconstruídas em fatias 2D utilizando-se o software NRecon (v.1.6.9.18, Skyscan, Bruker micro-CT, Bélgica) e, posteriormente, as análises tridimensionais foram realizadas utilizando o software CTAn (v.1.15.4.0, Bruker micro-CT, Bélgica).

Para análise da estrutura tridimensional das amostras, as fatias reconstruídas foram inicialmente binarizadas utilizando o software CTAn. O valor da escala de binarização para uma imagem é correspondente ao coeficiente de atenuação linear do tecido, sendo essa atenuação definida como a redução de intensidade de um feixe de raios X ao percorrer o tecido. Esses valores foram mantidos constantes para todas as análises em questão. Em seguida, a região do defeito ósseo foi definida e selecionada como a região de interesse (ROI – *Region of Interest*) das seções transversais de cada amostra para posterior análise morfométrica. A análise morfométrica foi realizada pelo software CTAn, obtendo-se como resultado: percentual de volume ósseo, espessura trabecular, separação trabecular, número trabecular e índices de conectividade.

Para obtenção dos valores de densidade mineral óssea, foi realizada a calibração do equipamento utilizando-se *phantoms*, materiais sintéticos que mimetizam o osso e apresentam valores de densidade semelhantes aos da hidroxiapatita. Foram utilizados *phantoms* de 0,25  $\text{g}/\text{cm}^3$  e 0,75  $\text{g}/\text{cm}^3$ , com 4 mm de diâmetro, aplicável a ossos de ratos (Bruker micro-CT, Bélgica). Os *phantoms* foram escaneados e reconstruídos utilizando-se os mesmos parâmetros das amostras de tibia. A densidade é calibrada no software CTAn, para posterior obtenção do resultado de densidade mineral óssea das amostras.

Os resultados foram expressos em valores percentuais dos parâmetros analisados como média  $\pm$  EP segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.

### 4.2.3 Processamento histológico

Após o procedimento de micro-CT, as tíbias que já haviam sido fixadas e estavam armazenadas em álcool 70% foram lavadas em água corrente por meio de três banhos de 15 minutos e, posteriormente, seguimos com o protocolo de desmineralização utilizando a solução de Planck Rychlo por 48 horas. Essa solução desmineralizadora contém cloreto de alumínio, ácido clorídrico, ácido fórmico e água. Posteriormente, as tíbias foram lavadas em água corrente para remoção do desmineralizador - três banhos de 15 minutos. A inclusão das tíbias ocorreu sequencialmente conforme detalhado na descrição abaixo:

**I) Desidratação:** As amostras foram desidratadas em séries crescentes de álcool etílico por 30 minutos cada.

- Álcool 70% - 2 x

- Álcool 80% - 2x

- Álcool 90% - 1x

- Álcool 95% - 1x

- Álcool 100% - 3 x

**II) Diafanização:** As amostras foram imersas em três banhos de xilol de 20 minutos cada.

**III) Infiltração:** As amostras receberam três banhos de parafina a 58°C, sendo o primeiro de 30 minutos e os demais de 40 minutos cada;

**IV) Inclusão:** As amostras foram incluídas em parafina fluidificada contida em moldes pré-definidos e posicionadas de modo que as tíbias pudessem ser cortadas longitudinalmente.

Foram obtidos cerca de 20 cortes semi-seriados de cada amostra com 6 µm de espessura no plano sagital, os quais foram montados em lâminas histológicas. Foram selecionados cortes alternados de cada amostra para serem corados com Tricrômico de Masson.

### Coloração com Tricrômico de Masson

Três lâminas de cada amostra com 1 corte cada foram processadas para a coloração com Tricrômico de Masson. Segue abaixo a descrição do protocolo.

- (I) imersão em xilol - 30 minutos

- (II) imersão em xilol - 15 minutos

- (III) imersão em xilol - 15 minutos

- (I) imersão em álcool etílico absoluto - 2 minutos

- (II) imersão em álcool etílico absoluto- 2 minutos
- (III) imersão em álcool etílico absoluto - 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 90% - 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 80% - 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 70% - 2 minutos
- lavagem em água corrente - 20 minutos
- imersão em solução de hematoxilina de Harris - 1 minuto
- lavagem em água corrente - 20 minutos
- imersão em solução de Tricrômico de Masson- 8 minutos
- 3 mergulhos rápidos em água corrente
- imersão em álcool etílico a 90% - 1 minuto
- imersão em álcool etílico a 95% - 1 minuto
- (I) imersão em álcool etílico absoluto - 1 minuto
- (II) imersão em álcool etílico absoluto - 1 minuto
- (III) imersão em álcool etílico absoluto - 1 minuto
- (I) imersão em xilol - 2 minutos
- (II) imersão em xilol - 2 minutos
- (III) imersão em xilol - 10 minutos

Após a coloração, lamínulas de 24 x 50 mm foram montadas sobre os cortes utilizando o Entellan como agente de união.

#### 4.2.4 Análise histológica e morfométrica

A partir dos cortes de cada defeito ósseo, foram capturadas 20 imagens utilizando a objetiva de 40X por meio da microcâmara JVC TK - 1270/RG do microscópio Zeiss. Foram seguidas as descrições da metodologia retratada por Caliari (1997) em relação ao imageamento microscópico, definição das condições de morfometria e fracionamento de imagens. As análises histológicas e morfométricas foram realizadas no Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia – ICB/UFMG.

Foi considerado o percentual de trabéculas ósseas presentes em relação à área total, denotado  $p$ , conforme a seguinte equação:

$$p = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{o_i}{t_i},$$

onde  $o_i$  e  $t_i$  representam a área ocupada por trabéculas ósseas e a área total da  $i$ -ésima imagem, respectivamente, para um total de  $n = 20$  imagens consideradas.

A área total ocupada pelas trabéculas ósseas foi obtida por meio do software de análise de imagens KS300 contido no analisador Carl Zeiss. Os pixels das trabéculas ósseas foram selecionados por meio da imagem real com posterior criação de uma imagem binária e obtenção da área em  $\mu\text{m}^2$ . As amostras que não apresentaram inclusões e colorações adequadas foram excluídas da análise. Os resultados foram expressos em valores percentuais de trabéculas ósseas como média  $\pm$  EP segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.

#### **4.2.5 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas para os ensaios de viabilidade usando one-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, migração celular usando one-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey, mineralização celular e ensaios *in vivo* usando one-way ANOVA seguido de pós-teste de Newman-Keuls. Foi utilizado o software GraphPad Prism 5 e os valores percentuais reportados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 5. Resultados

### 5.1 Análises *in vitro*

#### 5.1.1 Análise morfológica dos biocompósitos e interações celulares

A constituição e a arquitetura dos biomateriais desempenham um importante papel na adesão, migração e crescimento celular, resultando na promoção da regeneração tecidual. Algumas propriedades da superfície dos biomateriais como, por exemplo, a baixa rugosidade e/ou porosidade, podem influenciar a adesão e crescimento celular. Portanto, para a engenharia tecidual, é essencial investigar não só o biomaterial, mas também a interação entre as células e o material. Nesse sentido, investigamos se haveria diferenças morfológicas na superfície dos biocompósitos e como seria a distribuição do MTA e NTCPM entre as fibrilas de colágeno I. Além disso, em relação às células, buscamos conhecer a interação dos osteoblastos com os diferentes biocompósitos. Para tanto, realizamos preparações dos biocompósitos na ausência ou presença de células e analisamos essas preparações por meio de microscopia eletrônica de varredura.

Nas Figuras 5A-D, os biocompósitos à base de colágeno I apenas são mostrados em quatro concentrações distintas, variando de 1,5 a 2,5 mg/mL. Como apresentado nas figuras, não foram observadas diferenças aparentes entre as concentrações testadas, exceto para uma rede de colágeno mais densa como pôde ser visto na Figura 5D. Com base em estudos anteriores que mostraram ótima migração de fibroblastos (Kitten *et al.*, 1996), uma concentração intermediária de 1,75 mg/mL foi escolhida para as associações subsequentes de colágeno I com MTA e NTCPM. Os padrões de distribuição do MTA em dosagens de 1,6 e 12,8% (Figuras 5E-F) e NTCPM de 0,6 e 6,0% (Figuras 5G-H) foram analisados. Ambos MTA e NTCPM associados ao colágeno I mostraram-se com distribuição aglomerada na superfície dos biocompósitos e, adicionalmente, foram observados emaranhados entre as fibrilas de colágeno, conforme indicação pelas setas nas Figuras 5E-H.

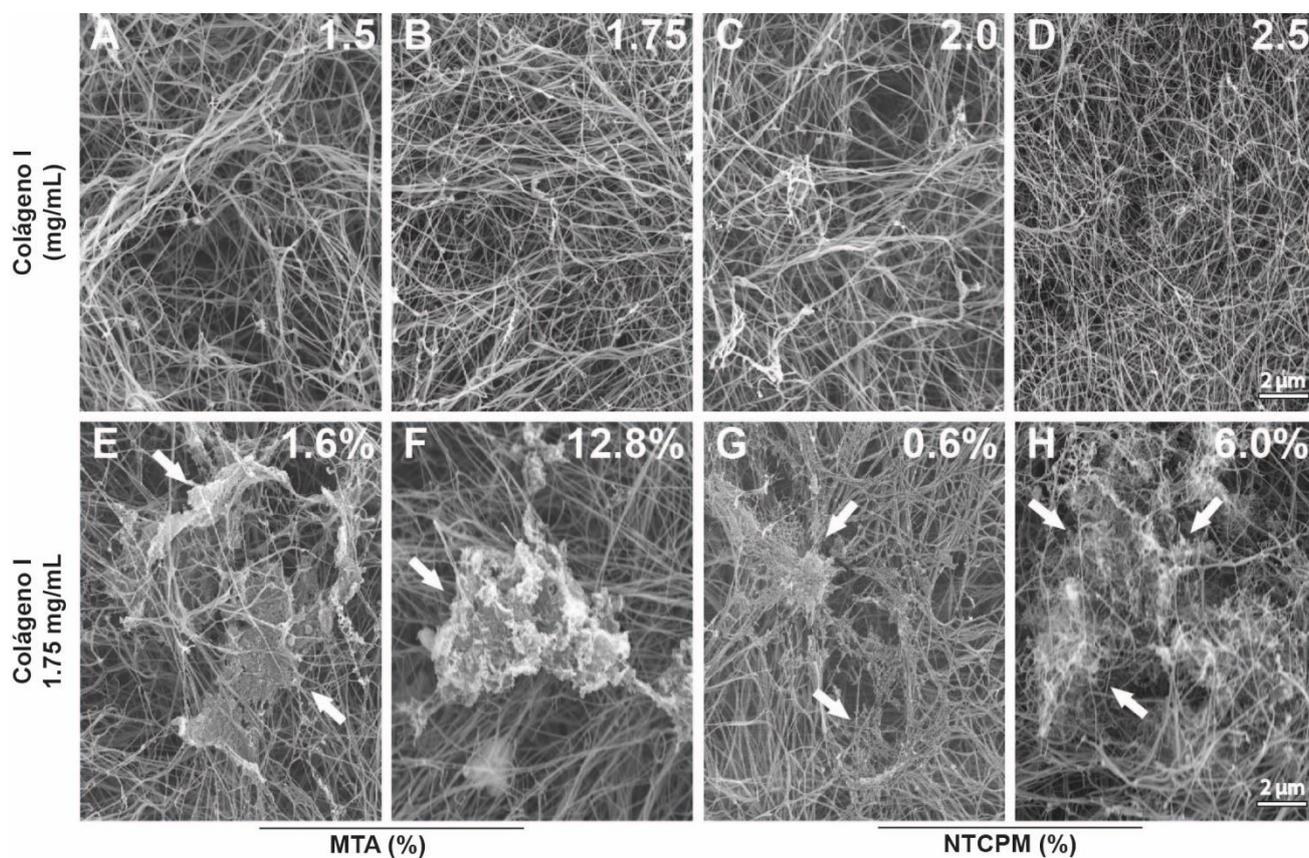
Posteriormente, analisamos as células MC3T3-E1 cultivadas nos biocompósitos por um período de sete dias (Figura 6). A análise do grupo colágeno I demonstrou que as células apresentaram alta confluência e interação célula-célula e célula-biocompósito bem estabelecida (Figura 6A-D). Essa interação e longas projeções citoplasmáticas também foram observadas nos osteoblastos cultivados em biocompósitos compostos por Col I + MTA (1,6 a 6,4%; Figuras 6E-G). O contato célula-biocompósito pode ser visto na Figura 6F (caixa e o inserto), a qual mostra uma grande área de MTA entremeadado com o colágeno I e um osteoblasto associado ao biocompósito. Além disso, a Figura 6G mostra projeções, assim como partes de corpos celulares incorporados ao

interior do biocompósito, o que sugere que osteoblastos são capazes de migrar para dentro do biocompósito. A dosagem mais elevada de MTA (12,8%) mostrou osteoblastos com morfologia distinta (Figura 6H) quando comparados aos grupos com dosagens mais baixas de MTA. Esses osteoblastos apresentaram uma morfologia arredondada e sem projeções citoplasmáticas visíveis. Essas células também foram observadas no interior do biocompósito, como indicado pela seta.

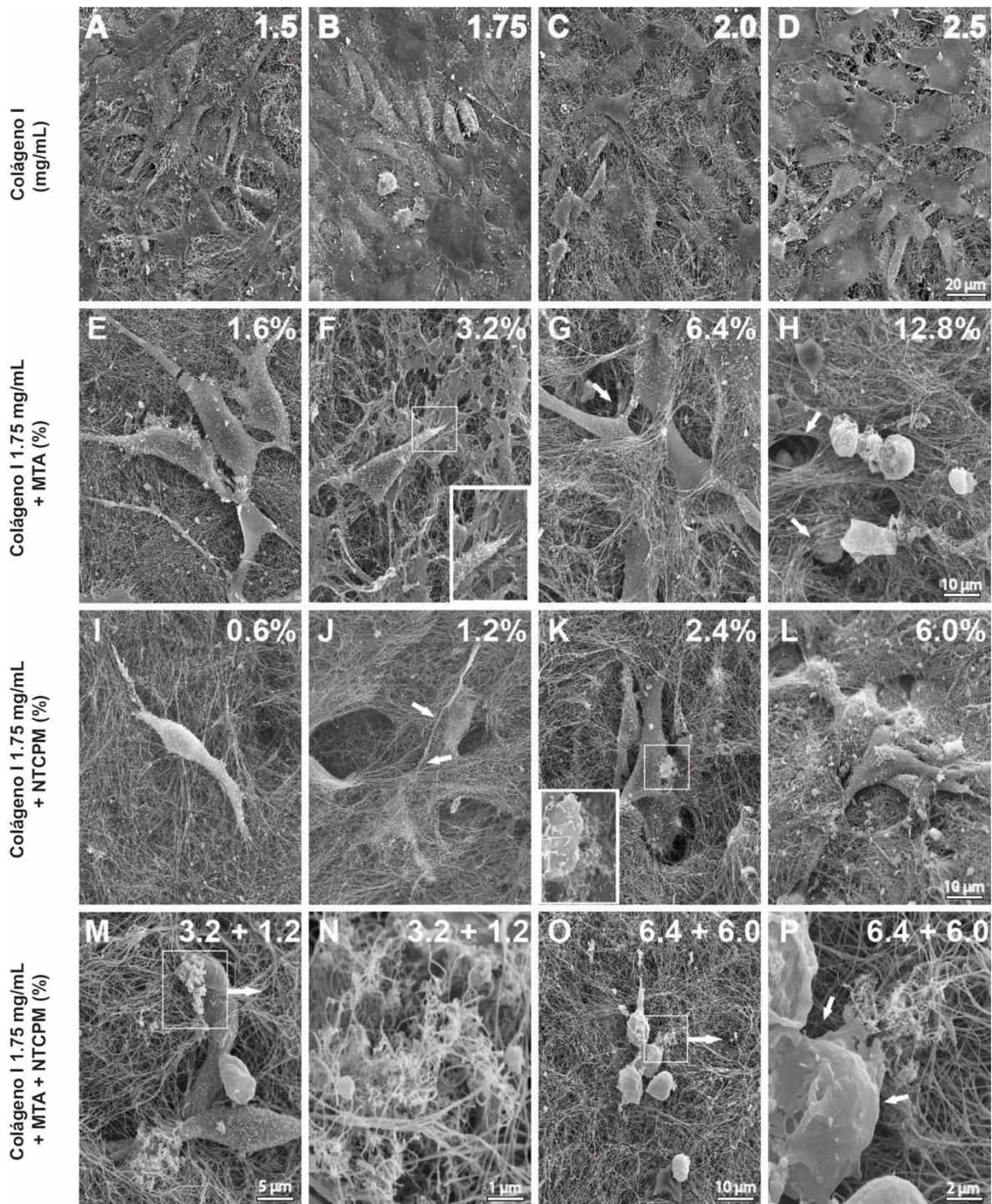
As células nos biocompósitos colágeno I + NTCPM apresentaram longas projeções citoplasmáticas e interação célula-célula, como mostrado nas Figuras 6I-L (por exemplo, como indicado pelas setas na Figura 6J). A figura também mostra uma grande fração do conteúdo citoplasmático de um osteoblasto dentro do biocompósito, indicando que os osteoblastos são capazes de migrar dentro do biocompósito colágeno I + NTCPM. Na Figura 6K, observa-se um osteoblasto em contato direto com NTCPM, conforme destacado na inserção da figura. A combinação dos três componentes Col I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2% está representada na Figura 6M. Os osteoblastos revelam uma típica morfologia alongada e aparecem em contato com NTCPM, caracterizado pelas finas redes entremeadas entre o colágeno I. Uma dosagem mais elevada da associação dos três componentes foi avaliada (Col I + MTA 6,4% + NTCPM 6,0%) e apresentou osteoblastos com morfologia arredondada (Figuras 6O-P). A Figura 6P destaca o osteoblasto em maior ampliação em contato com as finas redes do NTCPM, como indicado pelas setas. Em resumo, nossas análises por meio da microscopia eletrônica de varredura mostraram que o MTA e o NTCPM apresentam uma distribuição aglomerada na superfície dos biocompósitos e os osteoblastos apresentam morfologia típica com interação célula-célula e célula-biocompósito bastante preservadas.

Em seguida, buscamos investigar se a distribuição do MTA e NTCPM se manteria aglomerada e avaliamos as ultra-estruturas celulares dos osteoblastos cultivados no interior dos biocompósitos. Para isso, prosseguimos com as análises dos biocompósitos e das ultra-estruturas celulares em cultivo nesses scaffolds por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Iniciamos com a análise do biocompósito sem a presença de células, sendo escolhidos os grupos Col I + NTCPM 6,0% e Col I + MTA 6,4%. A Figura 7A mostra a associação de colágeno I com o NTCPM e, de fato, foi observada uma região de aglomerado filamentososo (destaque pela caixa), assim como fibrilas individuais de NTCPM dispersas no biocompósito (setas). A distribuição do MTA no interior do biocompósito (Figura 7B) se assemelha ao padrão de distribuição observado por meio da MEV, a saber, um aspecto aglomerado. A Figura 8 mostra os osteoblastos cultivados em biocompósitos tridimensionais após 14 dias de cultivo. Os osteoblastos apresentaram morfologia típica com projeções citoplasmáticas aparentes (PC) e o núcleo (N) apresentou um elevado nível de eucromatina, indicando atividade transcricional intensa. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as células cultivadas no grupo colágeno I e Col I + MTA 6,4% (Figura 8C-D). O

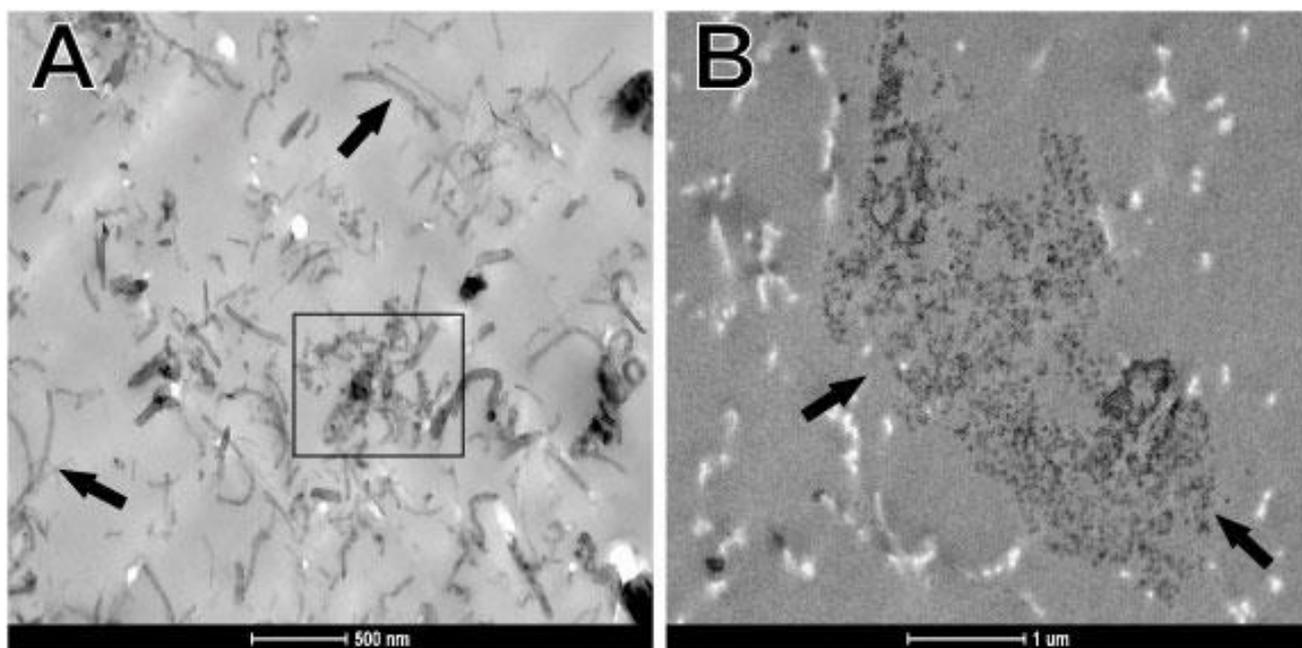
biocompósito contendo Col I + NTCPM 6,0% é mostrado nas Figuras 8E-F. Foi observada a presença de NTCPM dentro de vesícula citoplasmática no interior de osteoblastos (Figura 8E), bem como, em maior aumento, foram observados NTCPMs livres no citoplasma de osteoblastos (Figura 8F). Em conjunto, esses resultados sugerem que osteoblastos cultivados no interior dos biocompósitos apresentam longas projeções citoplasmáticas e, sobretudo, osteoblastos cultivados em biocompósitos contendo colágeno I + NTCPM são capazes de fagocitar NTCPMs, que se localizaram dispersos no citoplasma ou no interior de vesículas citoplasmáticas. Não foram observados NTCPMs no interior do núcleo celular.



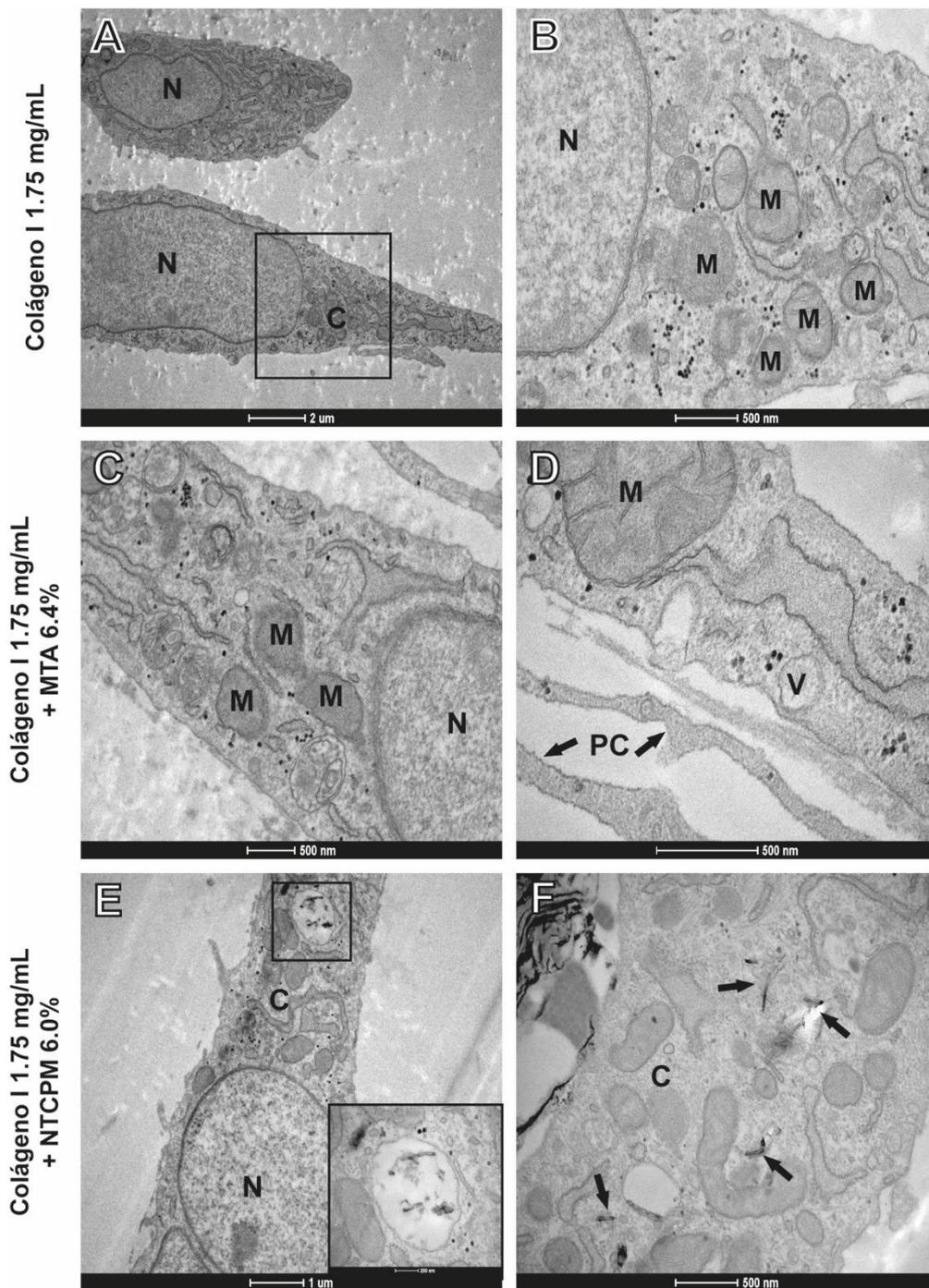
**Figura 5: Microscopia eletrônica de varredura dos biocompósitos.** (A-D) Colágeno I (mg/mL); (E-F) Colágeno I + MTA (%), setas indicam MTA; (G-H) Colágeno I + NTCPM (%), setas indicam NTCPM. A concentração de colágeno I presente nas associações com o MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL.



**Figura 6: Microscopia eletrônica de varredura das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes biocompósitos. (A-D) Colágeno I (mg/ml); (E-H) Colágeno I + MTA (%), caixa + inserto em (F) indicam parte final de um prolongamento celular em contato com MTA e setas em (G e H) indicam osteoblastos no interior do biocompósito; (I-L) Colágeno I + NTCPM (%), em (J) as setas indicam prolongamento ramificado de osteoblasto em cultivo e caixa + inserto em (K) indicam osteoblasto em contato com NTCPM; (M-N) Colágeno I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%, baixa e alta magnificação; (O-P) Colágeno I + MTA 6,4% + NTCPM 6,0%, baixa e alta magnificação. A concentração de colágeno I presente nas associações com o MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL.**



**Figura 7: Microscopia eletrônica de transmissão dos biocompósitos.** (A) Colágeno I + NTCPM 6,0%, setas indicam NTCPMs isolados e a caixa indica região com aglomerado de NTCPMs; (B) Colágeno I + MTA 6,4%, setas indicam região aglomerada de MTA. A concentração de colágeno I presente nas associações com o MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL.



**Figura 8: Microscopia eletrônica de transmissão das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes biocompósitos.** (A-B) Colágeno I 1,75 mg/mL, sendo a caixa o destaque para uma área citoplasmática com inúmeras mitocôndrias; (C-D) Colágeno I + MTA 6,4%; (E-F) Colágeno I + NTCPM 6,0%, sendo em (E) a região de caixa + inserto o destaque para uma vesícula contendo NTCPM e em (F) setas indicam NTCPMs livres no citoplasma. As letras destacadas indicam as seguintes estruturas: (N) núcleo; (C) citoplasma; (M) mitocôndrias; (PC) projeção citoplasmática e (V) vesícula. Alta magnificação está representado em A/C/E e baixa magnificação em B/D/F. A concentração de colágeno I em associação com MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL.

### 5.1.2 Análise da viabilidade dos osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais

Um dos desafios do campo da engenharia tecidual está na criação de scaffolds que possam substituir o tecido lesionado, mas que, ao serem transplantados, não levem à perda subsequente da viabilidade do tecido. Assim, um experimento essencial para a caracterização biológica de um biocompósito é a análise da toxicidade que esse novo material possa causar nas células em cultivo. Portanto, investigamos a toxicidade dos biocompósito por meio do ensaio de viabilidade celular usando o kit reativo LIVE/DEAD<sup>®</sup> (Molecular Probes - Life Technologies), contendo calceína AM e homodímero de etídio (EthD-1).

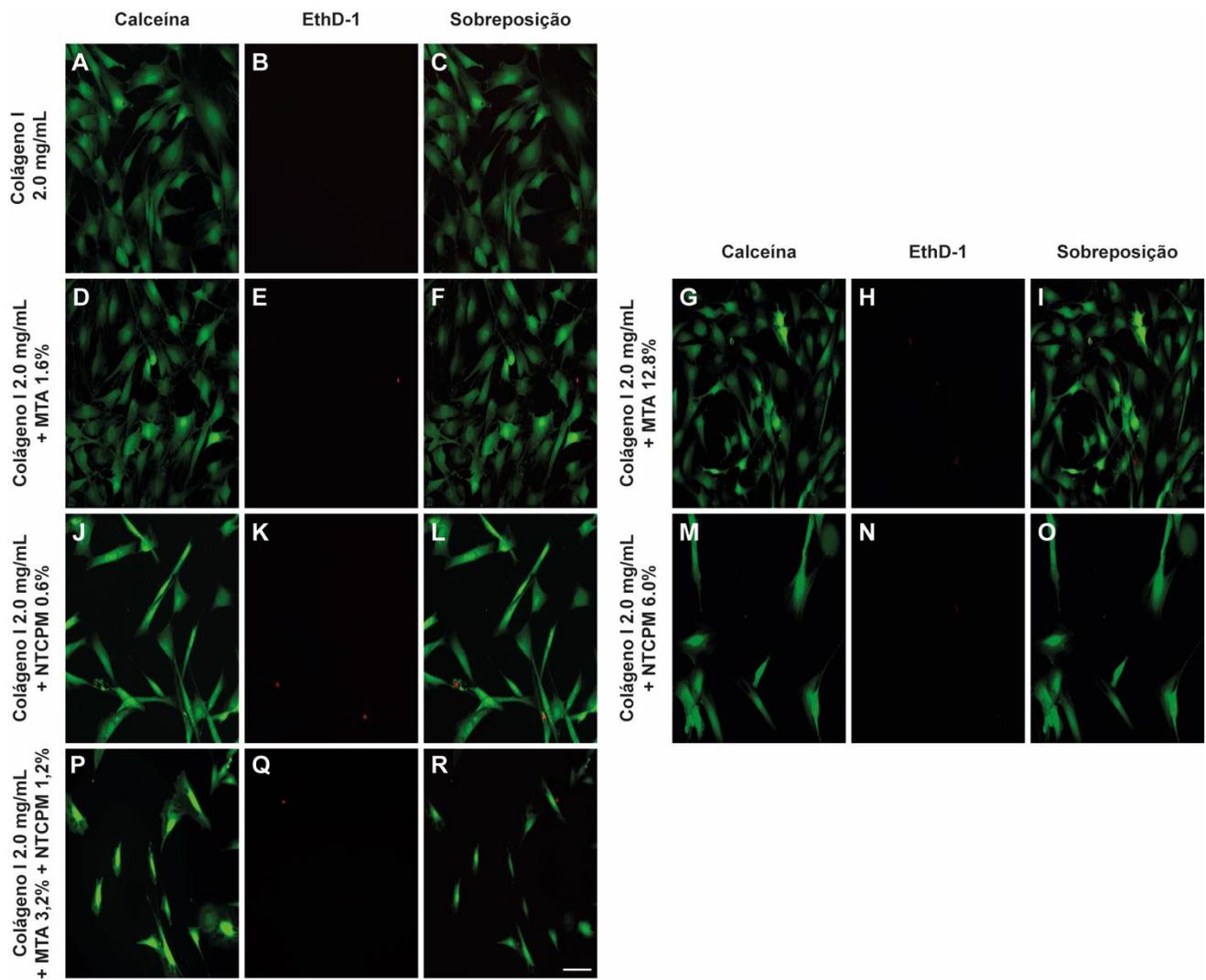
Como descrito na Seção 4.1.8, os osteoblastos foram plaqueados diretamente nas placas de cultura e, após a adesão, os biocompósitos foram adicionados por cima das células. Esses experimentos foram conduzidos em dois tempos, 24 e 48 horas. A Figura 9 mostra imagens obtidas na microscopia de fluorescência do ensaio de viabilidade no tempo de 48 horas, que representa maior exposição à toxicidade. Por concisão, apresentamos somente as imagens referentes à concentração de colágeno I que foi associada ao MTA e NTCPM, a saber, 2,0 mg/mL. Em particular, para os grupos MTA e NTCPM, apresentamos imagens de menor e maior porcentagem das combinações, uma vez que não houve diferenças significativas nos intervalos dos valores.

A Figura 9 mostra as células vivas marcadas pela acetometoxi-calceína (calceína-AM). O composto acetometoxi impede que uma parte da calceína forme quelato com o cálcio e, quando transportado pelas membranas celulares das células viáveis, esterases intracelulares removem esse composto. Sem a presença do acetometoxi, a calceína liga-se ao cálcio no interior da célula, onde agora fica aprisionada, resultando em uma forte fluorescência verde. Já as células mortas perdem a atividade das esterases e, por isso, não exibem fluorescência. O homodímero de etídeo (EthD-1) penetra facilmente em células mortas e se intercala ao DNA, refletindo a fluorescência de cor vermelha. As imagens listadas nas Figuras 9A-I não diferem visualmente quanto à morfologia e quantidade de células entre o grupo controle (colágeno I – 2 mg/mL) e o MTA nas concentrações de 1,6 e 12,8%. Já as células do grupo NTCPM nas concentrações de 0,6 e 6,0% e a combinação de colágeno I + MTA + NTCPM apresentaram morfologia fusiforme e confluência celular reduzida quando comparadas ao grupo colágeno I e colágeno I + MTA, conforme Figuras 9J-R.

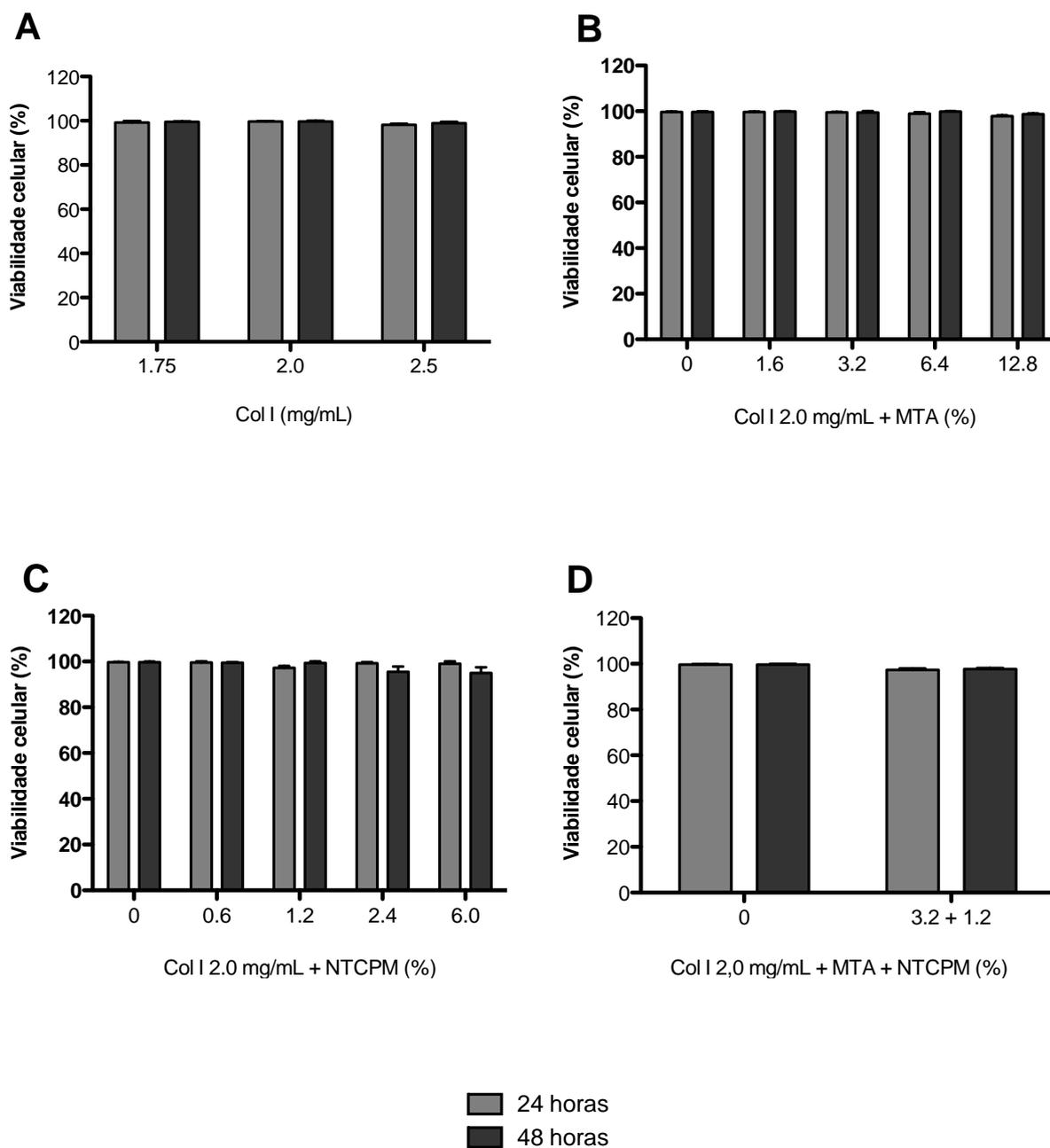
Após o diagnóstico morfológico e da confluência celular por imagem, prosseguimos com a quantificação da viabilidade nas diferentes combinações dos biocompósitos, como apresentado na Figura 10. Os experimentos foram realizados em triplicatas e, para cada réplica, foram registradas e analisadas 150 células com objetiva de 20X. Foram quantificadas células vivas, aquelas coradas pela

calceína, e células mortas, aquelas coradas pelo homodímero de etídio. Inicialmente, quantificamos a viabilidade no grupo colágeno I nas concentrações 1,75 / 2,0 / 2,5 mg/mL. Conforme mostrado na Figura 10A, houve viabilidade celular superior a 97% nas três concentrações de colágeno I avaliadas e o resultado não apresentou diferenças estatísticas entre as concentrações e os períodos dos experimentos.

Em seguida, quantificamos a viabilidade celular nas combinações de colágeno I + MTA, colágeno I + NTCPM e colágeno I + MTA + NTCPM, como mostrado nas Figuras 10B-D, respectivamente. Os resultados apresentados nessas figuras demonstram que, em todos os grupos de combinações avaliados, a quantificação da viabilidade celular foi superior a 90%. Embora as imagens nas Figuras 9J-R tenham demonstrado confluência celular baixa nos biocompósitos que receberam NTCPM, a taxa de sobrevivência das células MC3T3-E1 cultivadas nesses grupos foi elevada. Esse resultado sugere que os biocompósitos contendo NTCPM parecem afetar o ciclo de divisão celular dos osteoblastos e não necessariamente levam à morte, visto que um número reduzido de células foi corado pelo homodímero de etídeo.



**Figura 9: Microscopia de fluorescência das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos por 48 horas.** Células vivas são marcadas por calceína-AM (verde) e as mortas são marcadas por homodímero de etídeo (EthD-1) (vermelho). **(A-C)** Colágeno I 2,0 mg/mL; **(D-F)** Colágeno I + MTA 1,6%; **(G-I)** Colágeno I + MTA 12,8%; **(J-L)** Colágeno I + NTCPM 0,6%; **(M-O)** Colágeno I + NTCPM 6,0% e **(P-R)** Colágeno I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%. Apesar da viabilidade celular consistentemente alta em todos os biocompósitos avaliados, observa-se redução do número de células nos grupos NTCPM. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

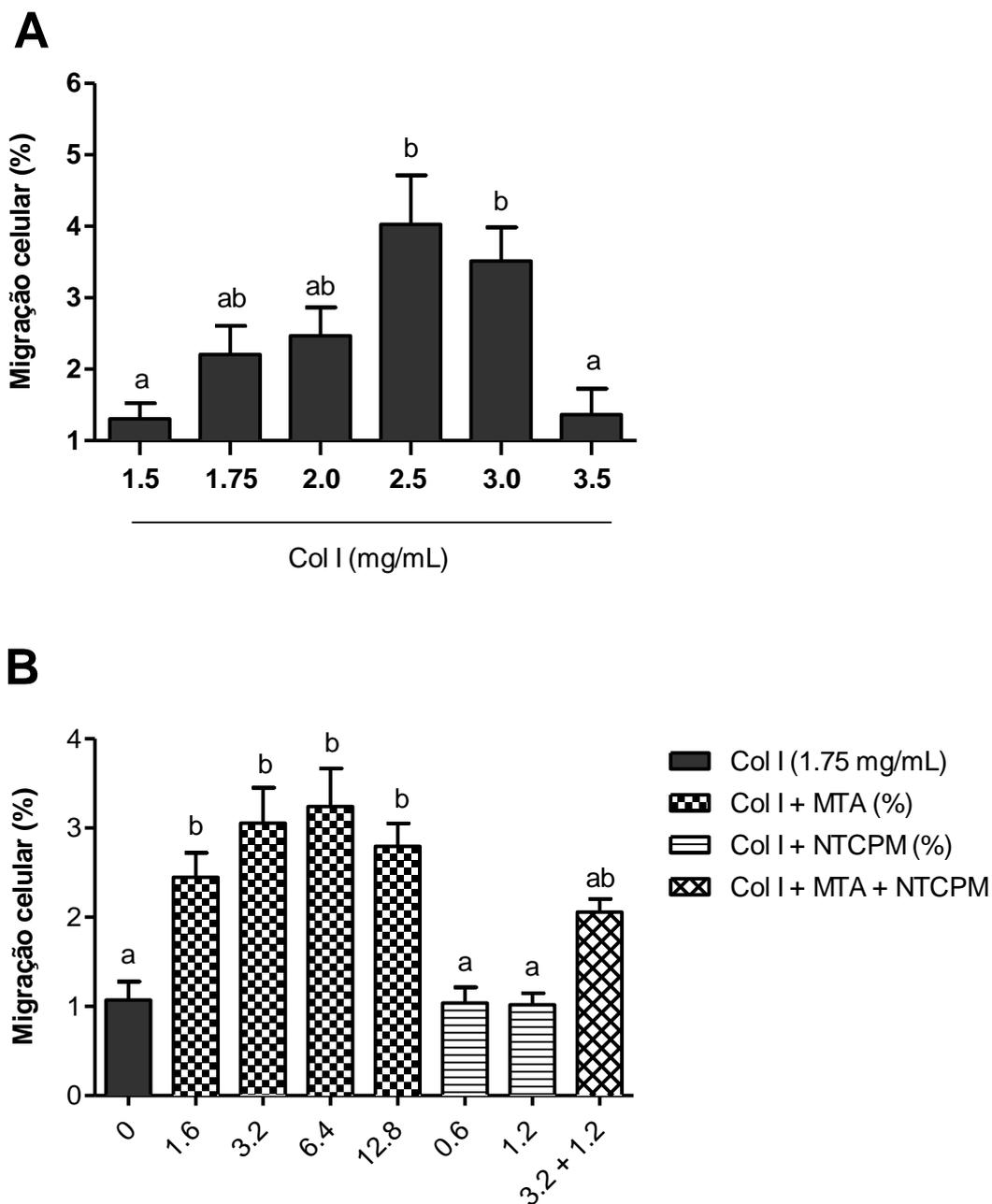


**Figura 10: Quantificação da viabilidade das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos no período de 24 e 48 horas. (A) Colágeno I (mg/ml); (B) Colágeno I + MTA (%); (C) Colágeno I + NTCPM (%); (D) Colágeno I + MTA + NTCPM. A concentração de colágeno I nas combinações com MTA e NTCPM foi de 2,0 mg/mL. Os valores percentuais reportados são expressos como média  $\pm$  EP para experimentos em triplicata, sendo observadas 150 células por réplica. Não houve diferença estatística entre as combinações e os tempos avaliados segundo one-way ANOVA com  $p < 0,05$  e pós-teste Bonferroni.**

### 5.1.3 Análise da migração de osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais

Para determinar se as diferentes combinações dos biocompósitos desempenham algum papel na migração das células MC3T3-E1, avaliamos, por ensaio de migração celular em biocompósitos tridimensionais, o efeito das concentrações ou combinações dos biocompósitos na migração celular. Como mostrado na Figura 11A, investigamos inicialmente se distintas concentrações de colágeno I (1,5 a 3,5 mg/mL) apresentavam algum efeito na migração de osteoblastos. Como apresentado nessa figura, o melhor desempenho da migração celular parece ser apresentado na concentração de 2,5 mg/mL de colágeno I. No entanto, concentrações entre 1,75 e 3,0 mg/mL não diferem estatisticamente dessa. De fato, o resultado apresentado demonstra que as concentrações de 1,75 a 3,0 mg/mL são as que potencialmente melhoram o desempenho da migração celular. Esses resultados foram de certa maneira surpreendentes, visto que, em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, outros tipos celulares como fibroblastos e células mesenquimais, por exemplo, demonstraram melhor desempenho na migração quando cultivados em colágeno I nas concentrações de 1,75 a 2,0 mg/mL (Schor *et al.*, 1982; Kitten *et al.*, 1996).

Mediante os resultados apresentados, investigamos se o efeito do colágeno I na migração celular poderia ser aumentado quando ocorresse a combinação com o MTA e/ou NTCPM. Como o efeito da densidade desses materiais na migração celular é desconhecido, fixamos a concentração média de 1,75 mg/mL de colágeno I para realizar as combinações. Como apresentado na Figura 11B, a associação de diferentes doses de MTA (1,6 a 12,8%) ao colágeno I estimulou a migração celular e foi significativamente superior em todas as combinações testadas, quando comparada ao controle colágeno I. Já a associação de NTCPM ao colágeno I não interferiu na migração celular quando comparada ao controle colágeno I. Esses resultados demonstram que o MTA parece exercer um efeito positivo na migração celular, enquanto o NTCPM parece ter um efeito inerte. Assim, nos questionamos se a combinação dos três componentes (colágeno I + MTA + NTCPM) restauraria o efeito positivo na migração celular observada nas várias configurações da combinação colágeno I + MTA. Para isso, realizamos a combinação de Col I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%. Os resultados mostram que essa combinação apresentou média superior a todas as configurações da combinação colágeno I + NTCPM, mas não se diferenciou estatisticamente de nenhum grupo avaliado (Figura 11B).



**Figura 11: Quantificação da migração das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes combinações de biocompósitos no período de 48 horas. (A) Colágeno I (mg/mL); (B) Colágeno I + MTA (%), Colágeno I + NTCPM (%), Colágeno I + MTA + NTCPM. A concentração de colágeno I nas combinações com MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL. Os valores percentuais reportados são expressos como média  $\pm$  EP para experimentos em triplicata, sendo observados três campos aleatórios por réplica. Grupos com pelo menos uma letra em comum apresentam equivalência estatística segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Tukey.**

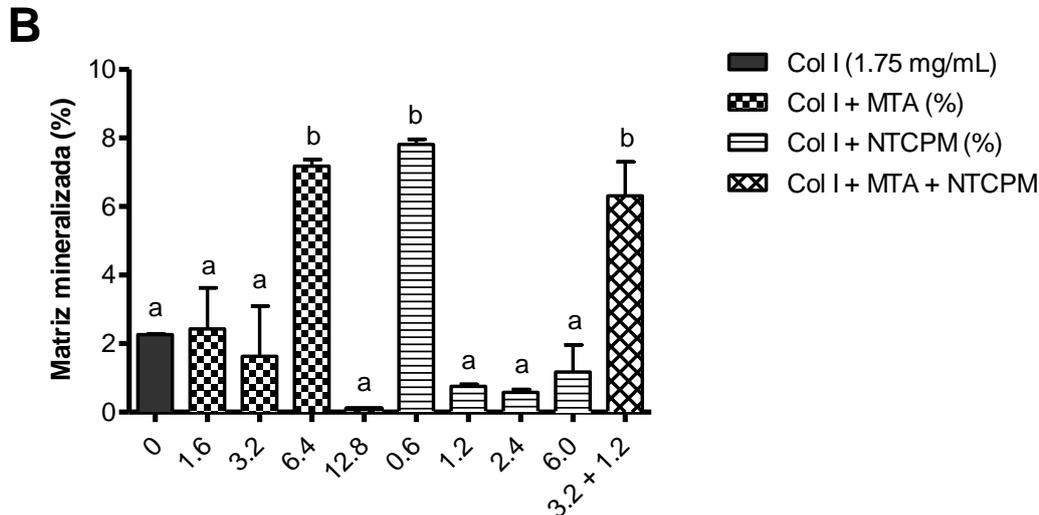
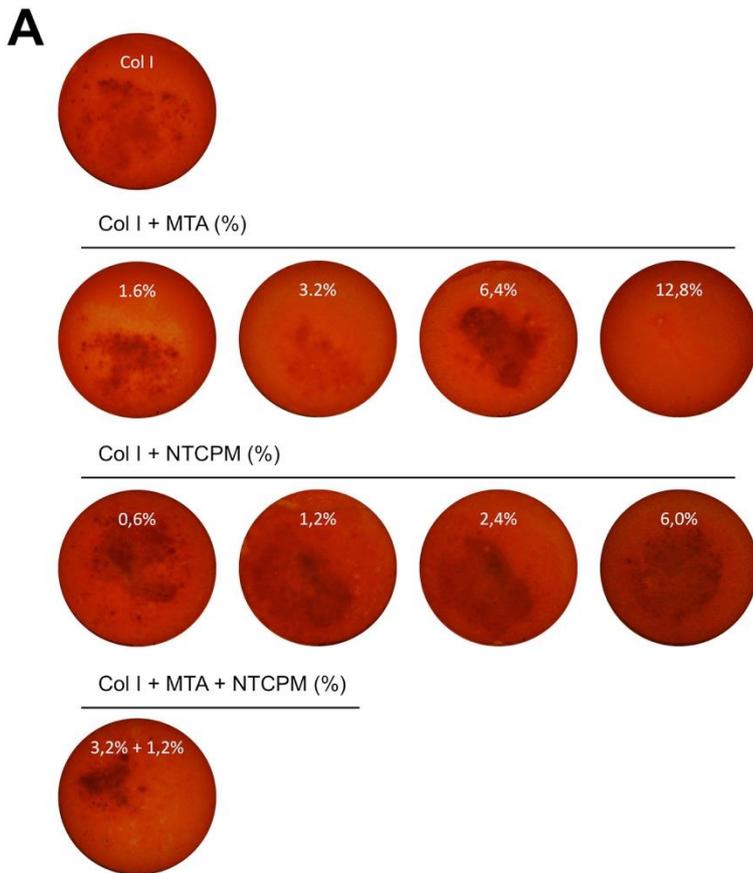
#### **5.1.4 Análise da mineralização de osteoblastos cultivados nos biocompósitos tridimensionais**

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado a importância de biomateriais tridimensionais na diferenciação de osteoblastos (Karageorgiou and Kaplan 2005; Akkouch *et al.*, 2011). A diferenciação é induzida não somente pelo arcabouço tridimensional, mas também pela presença de substâncias osteoindutoras que podem ser adicionadas ao meio de cultura celular.

Adicionalmente às análises mostradas nas sessões anteriores, é de fundamental importância determinar se os biocompósitos interferem na diferenciação e produção de matriz mineralizada pelas células MC3T3-E1. Para essa investigação, se fez necessário cultivar as células em ambiente tridimensional (“biocompósito em sanduíche”) por um período de 21 dias a fim de analisar a presença de matriz mineralizada por meio da marcação com o corante vermelho de Alizarina. Esse marcador possui alta afinidade por sais de cálcio e a presença de um colorido vermelho escuro indica a presença de matriz mineralizada (Figura 12A).

As imagens na Figura 12A demonstram que as células cultivadas no grupo colágeno I e colágeno I + MTA (%) formaram matriz mineralizada (regiões escurecidas espalhadas aleatoriamente na área do biocompósito) em menor proporção nas dosagens de 1,6 e 3,2% e maior proporção na dosagem 6,4% de MTA. Contrariamente, a dosagem 12,8% não demonstrou a presença de áreas de mineralização. Em seguida, as imagens do grupo colágeno I + NTCPM demonstraram que, em todas as dosagens de NTCPM avaliadas, houve a formação de matriz mineralizada. De forma mais pronunciada, a dosagem 0,6% apresentou regiões com maiores agregados de mineralização e coloração mais escurecida. Após o diagnóstico positivo da formação de matriz mineralizada, seguimos com a avaliação da combinação dos três componentes (Col I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%). A imagem demonstrou que os osteoblastos cultivados formaram matriz mineralizada e, especialmente, áreas de mineralização mais concentradas e de cor escurecida.

Os resultados quantitativos das áreas de mineralização apresentados na Figura 12B comprovaram a análise histológica. Nessa figura, observa-se que os grupos Col I + MTA 6,4% e colágeno I + NTCPM 0,6% foram significativamente capazes de aumentar a formação de matriz mineralizada em relação ao controle colágeno I. A combinação dos três componentes, Col I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%, foi significativamente superior ao controle colágeno I e aos seus componentes individualizados. Esses dados, portanto, sugerem que as melhores combinações de biocompósitos para a formação de matriz mineralizada pelos osteoblastos são: Col I + MTA 6,4%, Col I + NTCPM 0,6% e Col I + MTA 3,2% + NTCPM 1,2%.



**Figura 12: Análise da mineralização de osteoblastos cultivados em diferentes biocompósitos. (A)** Áreas de mineralização das células MC3T3-E1 cultivadas em diferentes biocompósitos durante 21 dias. **(B)** Quantificação das áreas de mineralização dos seguintes grupos: colágeno I, colágeno I + MTA, colágeno I + NTCPM, colágeno I + MTA + NTCPM. A concentração de colágeno I nas combinações com MTA e NTCPM foi de 1,75 mg/mL. Os valores percentuais reportados são expressos como média  $\pm$  EP para experimentos em duplicata, onde foram observadas áreas de mineralização com distribuição aleatória. Grupos com pelo menos uma letra em comum apresentam equivalência estatística segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.

## 5.2 Análises *in vivo*

### 5.2.1 Análise histológica da regeneração óssea

Sete dias após o procedimento cirúrgico, as tíbias de controle (coágulo) apresentaram tecido de granulação na região central do defeito com capilares neoformados. Às margens do defeito observaram-se trabéculas ósseas mais maduras, que se estenderam para a região central, a qual se apresentou desprovida de trabéculas ósseas (Figuras 13 A1/A2).

Dentre as concentrações de colágeno I avaliadas na regeneração óssea (Figuras 13 B-E), as tíbias referentes à concentração de 2,0 mg/mL apresentaram melhor organização e maior volume das trabéculas ósseas neoformadas quando comparadas às demais concentrações de colágeno I e ao coágulo, além de redução no espaço inter-trabecular (Figuras 13 D1/D2). Particularmente, a concentração 2,5 mg/mL apresentou região central com elevado infiltrado inflamatório e reduzida formação óssea (Figuras 13 E1/E2), sendo que a seta em amarelo indica áreas de possível retração tecidual, ocasionadas no preparo da amostra.

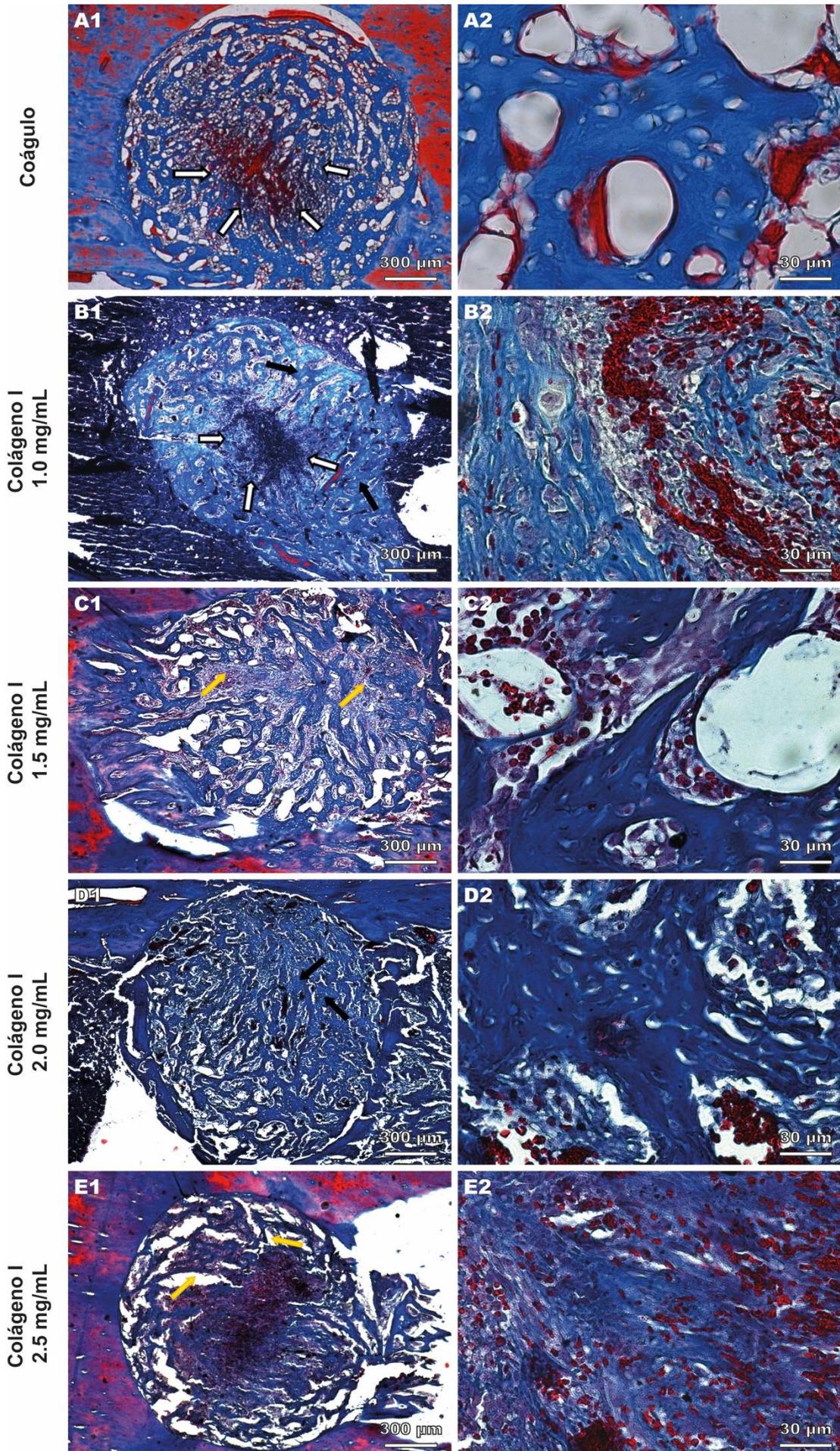
De forma geral, as tíbias do grupo colágeno I + MTA (%) apresentaram boa formação de trabéculas ósseas, sendo observado um bom preenchimento de trabéculas neoformadas na área do defeito (Figuras 13 F-I). No entanto, de forma mais expressiva, a concentração Col I + MTA 3,2% apresentou trabéculas ósseas mais maduras, com presença de numerosos osteócitos e espaços medulares contendo tecido medular ou tecido conjuntivo frouxo (Figuras 13 G1/G2).

A análise histológica do grupo colágeno I + NTCPM (%) demonstrou que as concentrações de Col I + NTCPM (0,6% e 6,0%) apresentaram melhor organização do osso trabecular neoformado (Figuras 13 J1/J2 e M1/M2), além de melhor preenchimento de volume ósseo na área do defeito. Em contraste, as demais concentrações desse grupo evidenciaram escassez de osso trabecular na região central (NTCPM 1,2%) e maior espaçamento entre as trabéculas ósseas (NTCPM 2,4%) (Figuras 13 K1/K2 e L1/L2).

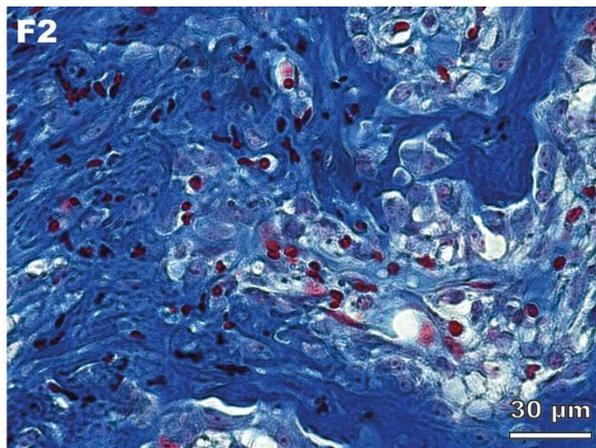
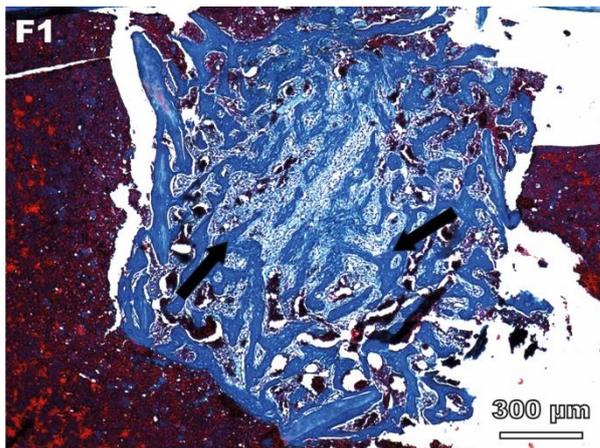
A combinação de MTA 3,2% + NTCPM 0,6% apresentou formação de osso trabecular mais abundante na região periférica e intensa formação de capilares entre as trabéculas ósseas (Figuras 13 N1/N2). Os tratamentos com os controles carbopol + MTA 3,2% e carbopol + NTCPM 0,6% demonstraram reduzida formação óssea, sendo evidenciado tecido não mineralizado e presença de células do tecido de granulação. Não foram evidenciadas diferenças histológicas relevantes entre os grupos carbopol (Figuras 13 O-P).

De maneira geral, as análises demonstraram que os grupos que receberam tratamento com os biocompósitos apresentaram formação óssea mais expressiva quando comparados aos controles.

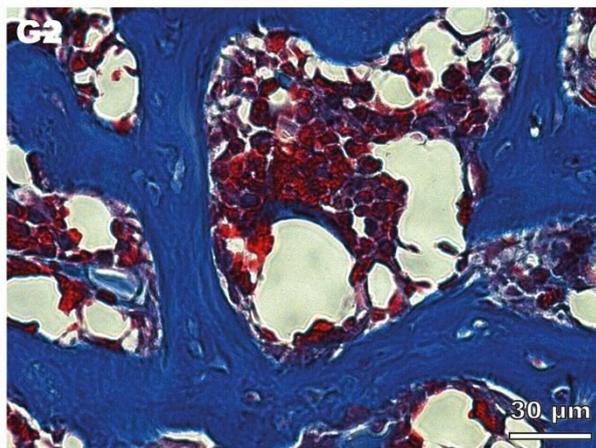
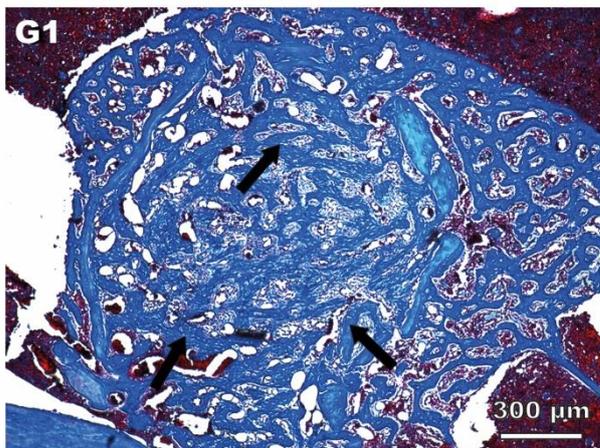
**Figura 13: Fotomicrografias representativas de secções histológicas de tíbias após cirurgias para realização de defeito ósseo e tratadas com biocompósitos por 7 dias.** (1) Baixa magnitude e (2) Alta magnitude. Os tratamentos das tíbias apresentadas nessa figura estão representadas da seguinte maneira: **(A)** Controle (coágulo); **(B-E)** Colágeno I (mg/mL); **(F-I)** Colágeno I 2,0 mg/mL + MTA (%); **(J-M)** Colágeno I 2,0 mg/mL + NTCPM (%); **(N)** Colágeno I 2,0 mg/mL + MTA 3,2% + NTCPM 0,6%; **(O)** Carbopol + MTA 3,2% e **(P)** Carbopol + NTCPM 0,6%. Setas pretas em B1 e D1: trabéculas ósseas; setas brancas em A1 e B1: tecido de granulação; setas amarelas em C1: espaço intertrabecular e setas amarelas em E1 área de possível retração tecidual;



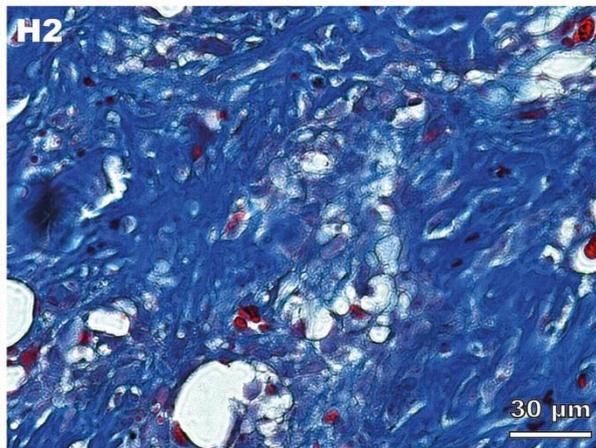
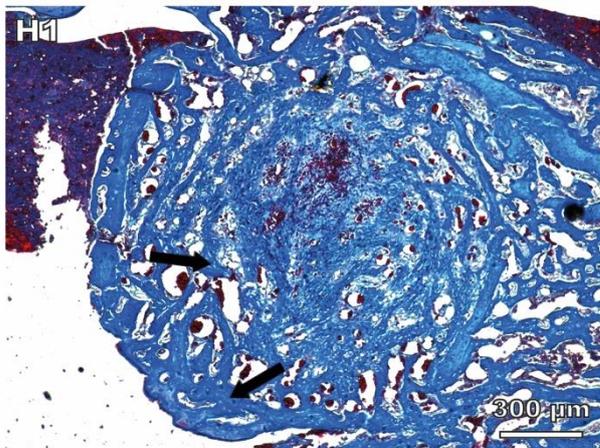
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ MTA 1.6%



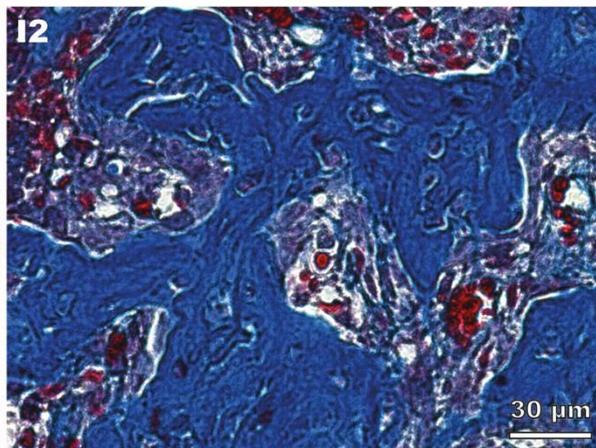
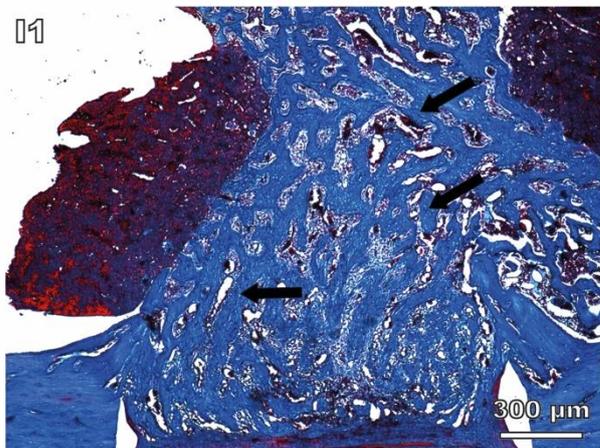
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ MTA 3.2%



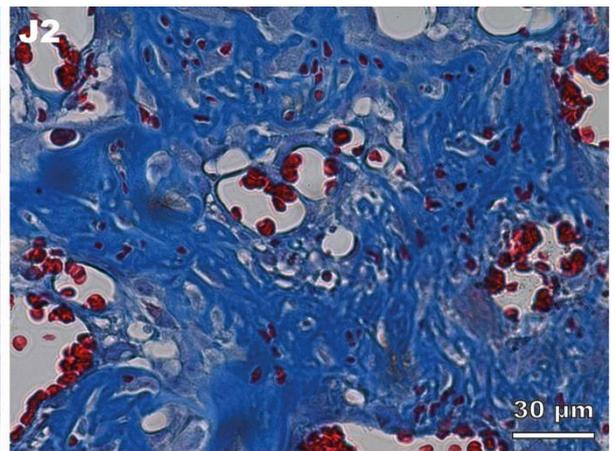
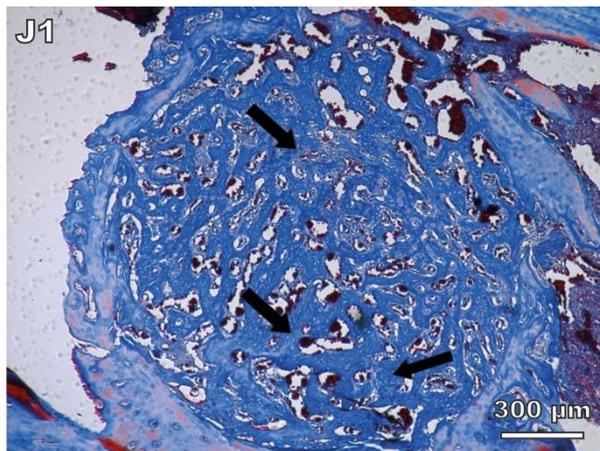
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ MTA 6.4%



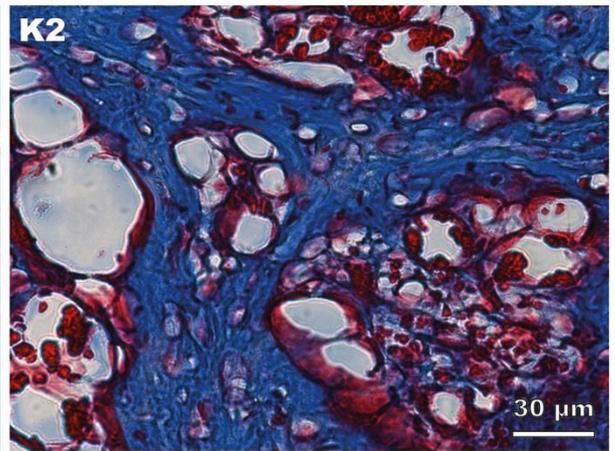
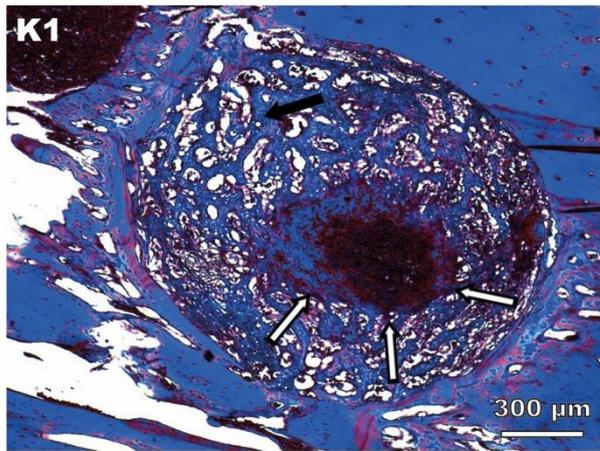
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ MTA 12.8%



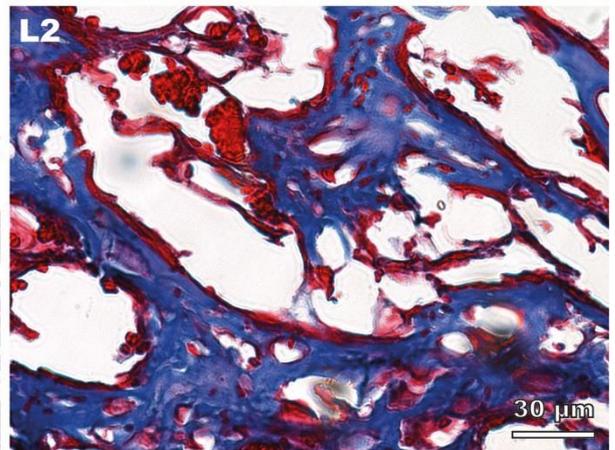
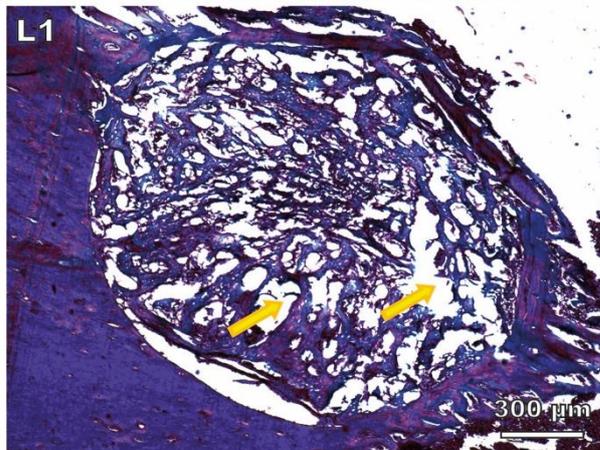
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ NTCPM 0.6%



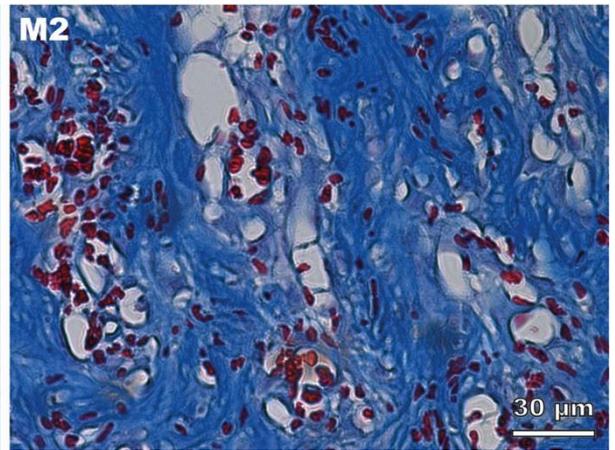
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ NTCPM 1.2%



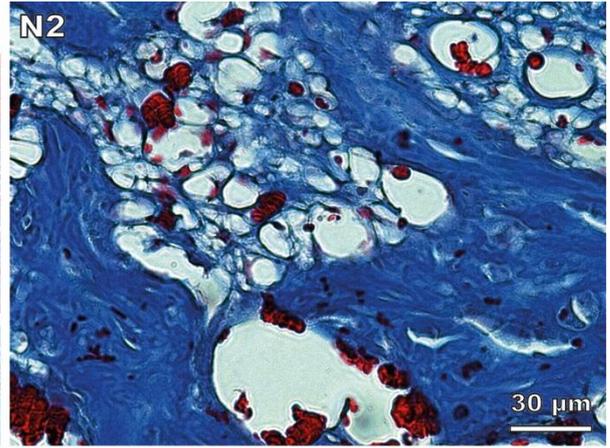
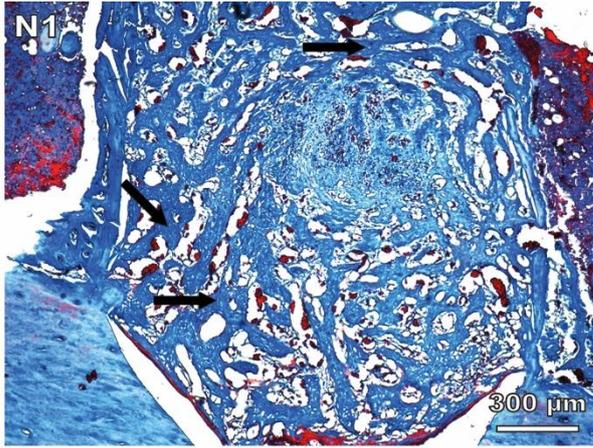
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ NTCPM 2.4%



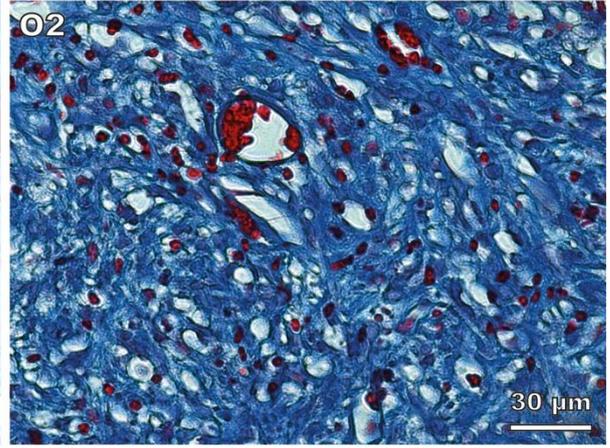
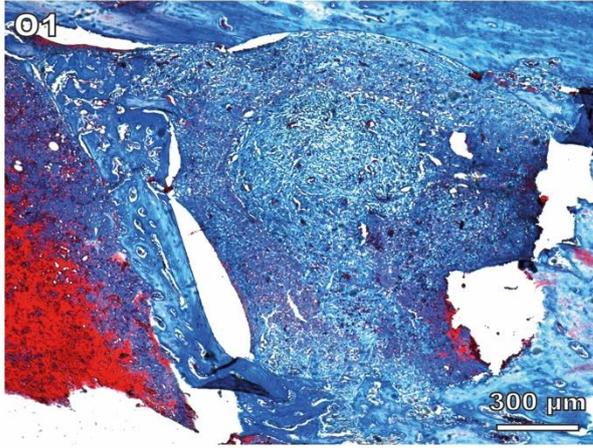
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ NTCPM 6.0%



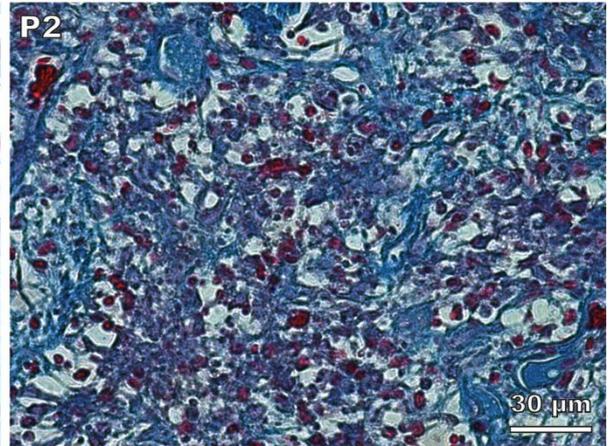
Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ MTA 3.2% + NTCPM 0.6%



Carbopol + MTA 3.2%



Carbopol + NTCPM 0.6%

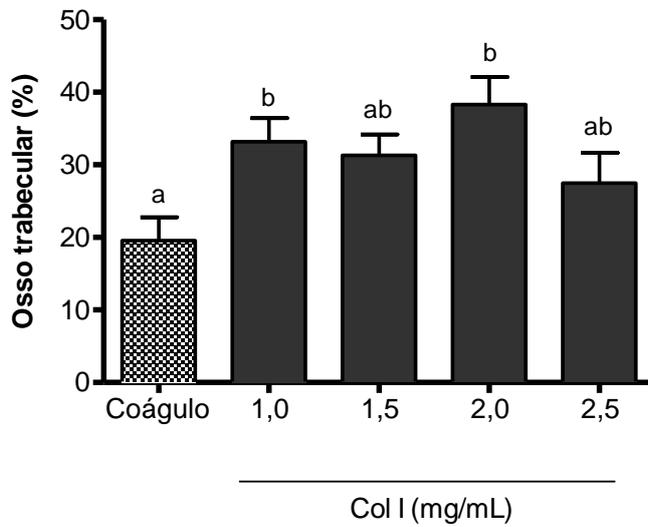
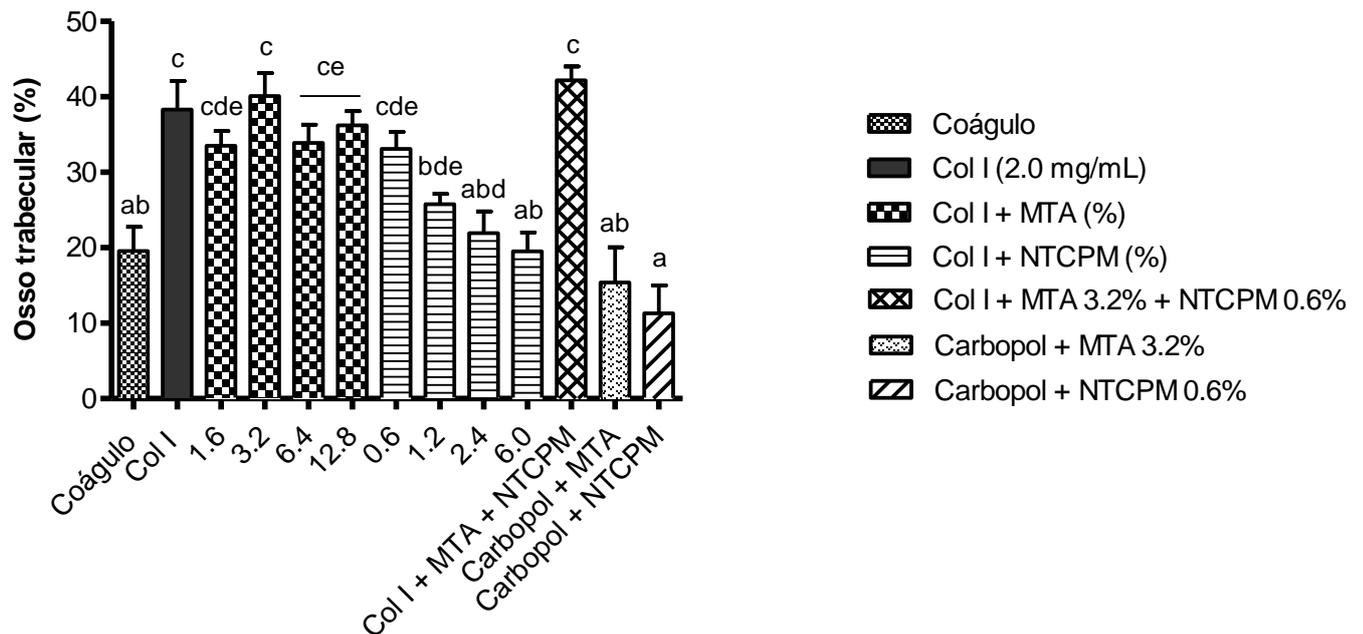


### 5.2.2 Análise morfométrica da regeneração óssea

Inicialmente investigamos por análise morfométrica qual concentração de colágeno I apresentaria melhor formação de osso trabecular no período de sete dias. A Figura 14A demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas, em relação à área total, foi significativamente maior nas tíbias tratadas com colágeno I 1,0 ( $33,17 \pm 3,24$  %) e 2,0 mg/mL ( $38,30 \pm 3,81$  %) em relação ao controle coágulo ( $19,54 \pm 3,23$  %). A partir desse resultado, padronizamos a concentração de 2,0 mg/mL, que apresentou média superior na formação do osso trabecular, para realizar as combinações com o MTA e/ou NTCPM.

Os resultados dos tratamentos colágeno I combinado ao MTA e/ou NTCPM estão apresentados na Figura 14B. Em particular, todas as combinações de colágeno I + MTA (%) foram significativamente superiores ao coágulo e aos controles carbopol (MTA 3,2% e NTCPM 0,6%), porém, equivalentes ao colágeno I puro. Adicionalmente, todas as diferentes combinações de colágeno I + MTA foram equivalentes entre si na formação do osso trabecular.

Os resultados do grupo colágeno I + NTCPM (%) demonstraram que a combinação Col I + NTCPM 0,6% foi significativamente superior ao coágulo e aos controles carbopol, porém, estatisticamente equivalente ao colágeno I puro. Comparada à melhor combinação de Col I + MTA (3,2%), a combinação Col I + NTCPM 0,6% não apresentou diferença estatística. A combinação dos três componentes do scaffold não apresentou ganhos estatísticos comparados às melhores combinações individuais utilizando MTA (3,2%) e NTCPM (0,6%), porém foi significativamente superior a todos os controles considerados. Ao contrário dos resultados observados na quantificação das áreas de mineralização *in vitro* na Seção 5.1, nenhuma das combinações testadas *in vivo* foi estatisticamente superior ao colágeno I puro.

**A****B**

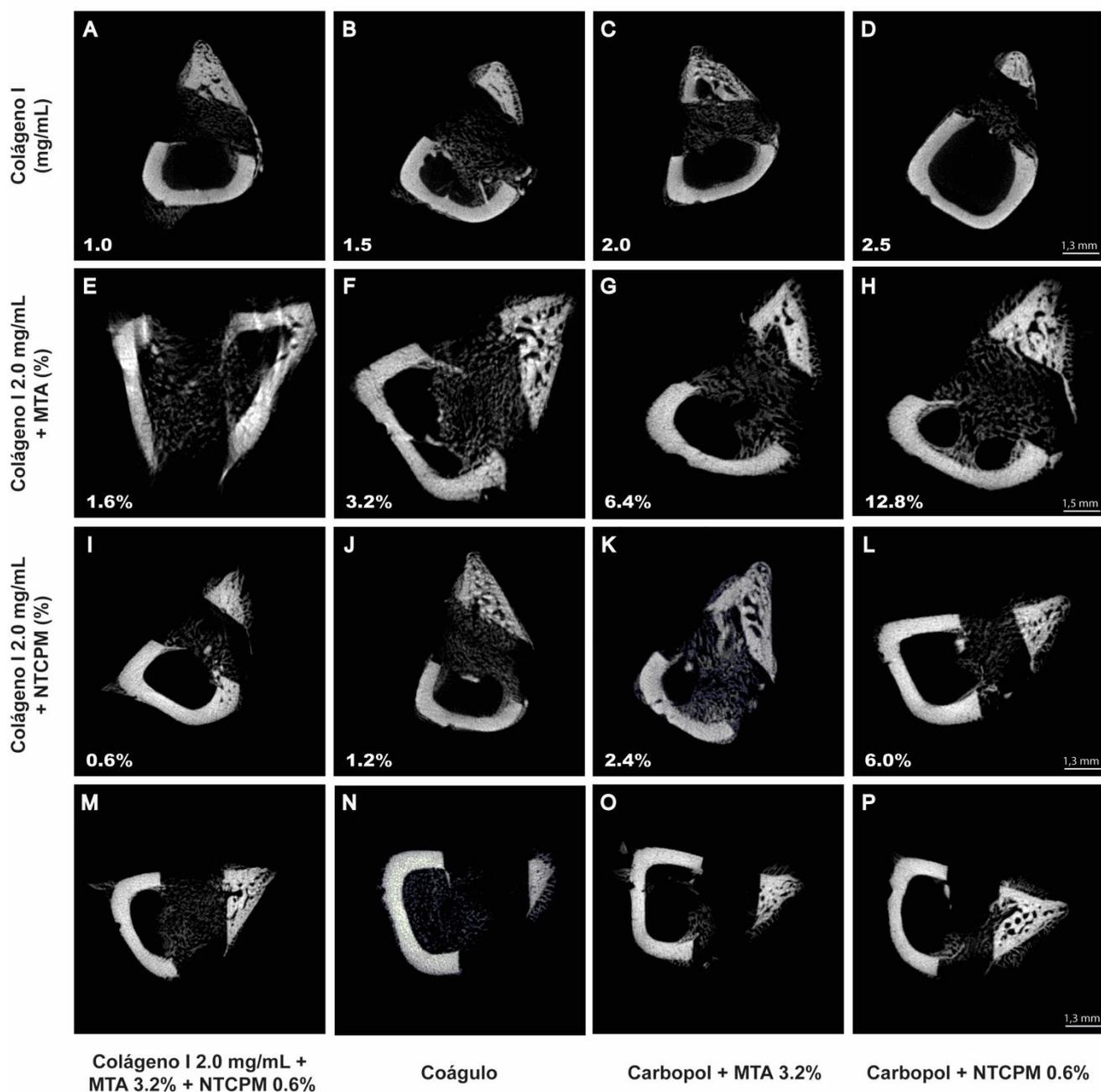
**Figura 14: Quantificação morfométrica da formação de trabéculas ósseas na regeneração de tíbias após 7 dias de tratamento com diferentes biocompósitos. (A) Coágulo e Colágeno I (mg/mL); (B) Coágulo, Col I (2,0 mg/mL), Col I + MTA (%), Col I + NTCPM (%), Col I + 3,2% MTA + 0,6% NTCPM, Carbopol + 3,2% MTA e Carbopol + 0,6% NTCPM. Os valores percentuais reportados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. Grupos com pelo menos uma letra em comum apresentam equivalência estatística segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.**

## 5.2.3 Avaliação da microtomografia computadorizada

### 5.2.3.1 Análise da reconstrução 2D da regeneração óssea

Para a visualização das reconstruções microtomográficas 2D foi utilizado o software Dataviewer o qual permitiu a análise da tibia no plano transversal (Figura 15). O defeito ósseo foi realizado na região proximal das tíbias, ao longo do eixo látero-lateral, sendo perfuradas ambas as corticais.

As Figuras 15A-D apresentam imagens das tíbias que receberam o tratamento com o biocompósito colágeno I puro. A análise das imagens demonstra que a tibia referente ao tratamento de colágeno I 2,0 mg/mL apresentou maior área de formação óssea ao longo da região do defeito quando comparado com as demais concentrações avaliadas (Figura 15C). As imagens referentes ao tratamento com os biocompósitos colágeno I + MTA (%) mostraram que a combinação Col I + MTA 3,2% foi capaz de preencher quase toda a extensão da área do defeito com osso trabecular neoformado em comparação com as outras combinações deste grupo (Figura 15F). As tíbias do grupo colágeno I + NTCPM (%) apresentaram melhor formação de osso trabecular nas combinações Col I + NTCPM 1,2% e 2,4% (Figura 15J-K). A combinação dos três componentes Col I + MTA 3,2% + NTCPM 0,6% apresentou melhor preenchimento de osso trabecular na área do defeito quando comparado com os controles coágulo, carbopol + MTA 3,2% e carbopol + NTCPM 0,6% (Figuras 15M-P). Adicionalmente, os tratamentos carbopol + MTA 3,2% e carbopol + NTCPM 0,6% apresentaram baixa formação de osso trabecular na região do defeito equivalentes ao coágulo. Todas essas observações estão de acordo com a análise morfométrica (Figura 14).

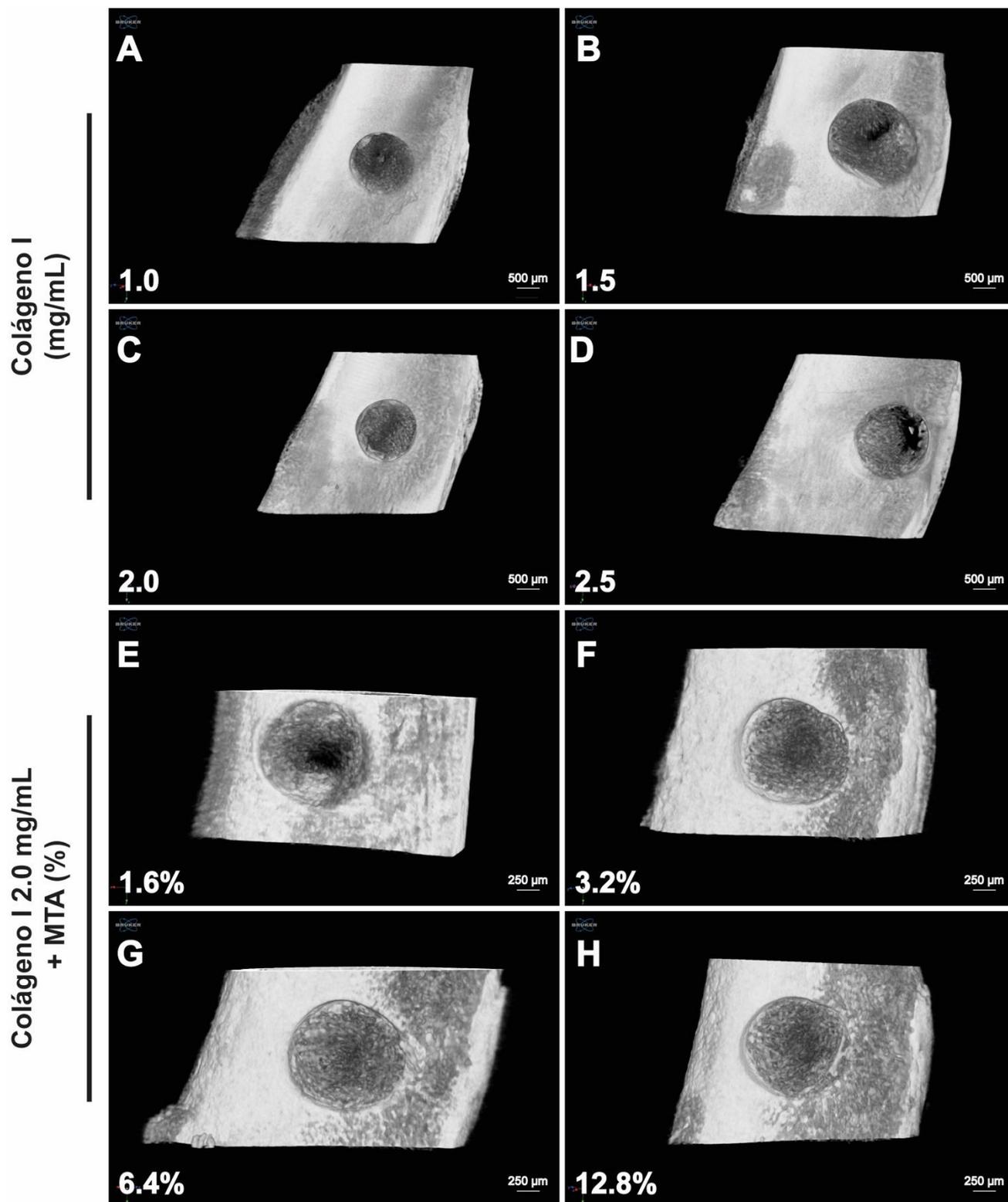


**Figura 15: Reconstrução 2D das tíbias submetidas a defeito ósseo e tratamento por 7 dias com diferentes biocompósitos. (A-D) Colágeno I (mg/mL); (E-H) Colágeno I + MTA (%); (I-L) Colágeno I + NTCPM (%); (M) Colágeno I 2,0 mg/mL + 3,2% MTA + 0,6% NTCPM; (N) Coágulo; (O) Carbopol + 3,2% MTA e (P) Carbopol + 0,6% NTCPM.**

### **5.2.3.2 Análise da reconstrução 3D da regeneração óssea**

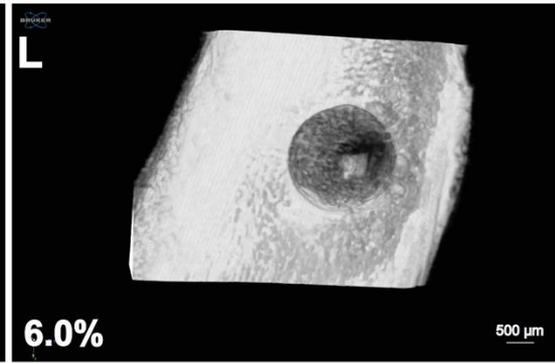
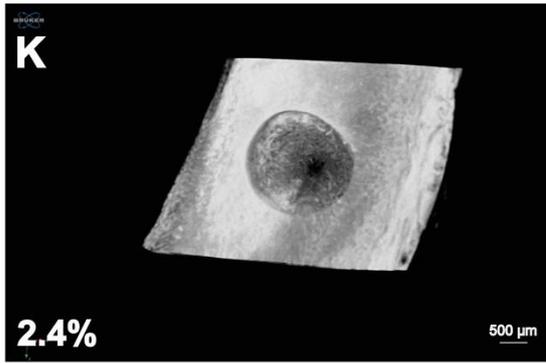
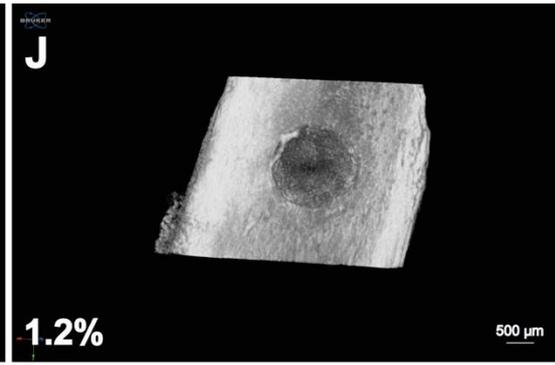
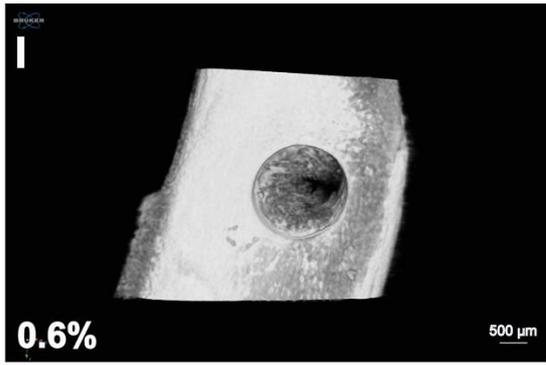
As imagens da reconstrução 3D mostrada na Figura 16 permitiu a avaliação estrutural e arquitetônica do processo de regeneração óssea, as quais foram posteriormente avaliadas em diferentes parâmetros.

As análises das reconstruções 3D corroboraram parcialmente com as interpretações descritas nas imagens das reconstruções 2D. Conforme apresentado nas imagens do grupo colágeno I (Figuras 16A-D), a concentração 2,0 mg/mL apresentou melhor restauração da área do defeito, quando comparados às demais concentrações do grupo. As combinações Col I + MTA (3,2 / 6,4 e 12,8%) apresentaram similaridade no preenchimento da regeneração óssea na área do defeito (Figuras 16F-H), quando comparados à combinação colágeno I + MTA 1,6% que apresentou área central não ocupada por trabéculas ósseas neoformadas (Figura 16E). Os tratamentos com os biocompósitos colágeno I combinado aos NTCPMs apresentaram melhores resultados nas combinações de Col I + NTCPM 1,2 e 2,4% (Figuras 16 J-K). Na região avaliada, a regeneração tecidual apresentou uma discreta cavidade central não ocupada por trabéculas ósseas, enquanto os demais tratamentos do grupo apresentam maior área central não regenerada (Figuras 16 I / L). Na combinação dos três componentes Col I + MTA 3,2% + NTCPM 0,6% houve melhor regeneração da área do defeito quando comparado aos controles coágulo, carbopol + MTA 3,2% e carbopol + NTCPM 0,6%. As imagens das tíbias controles (Figuras 16 N-P) mostraram maiores cavidades centrais nas áreas do defeito quando comparado aos demais tratamentos. Portanto, a visualização das imagens 2D e 3D da regeneração das tíbias em tratamento com os biocompósitos permitiu avaliar qualitativamente a regeneração óssea e observar a resposta terapêutica no tempo de 7 dias.

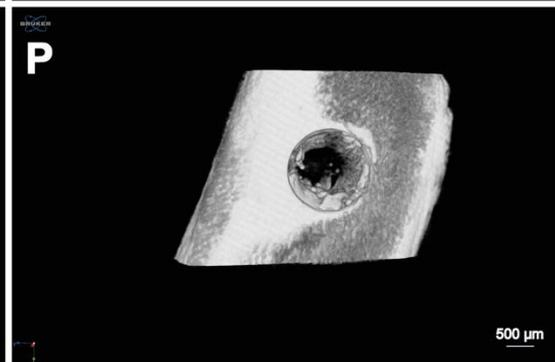
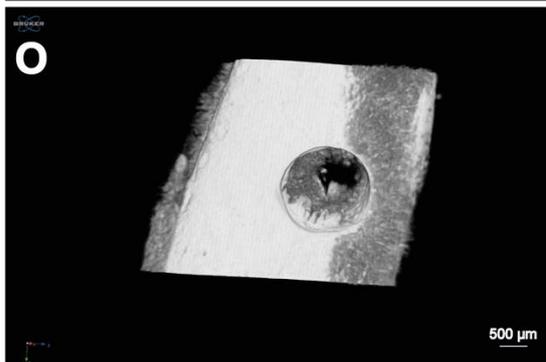
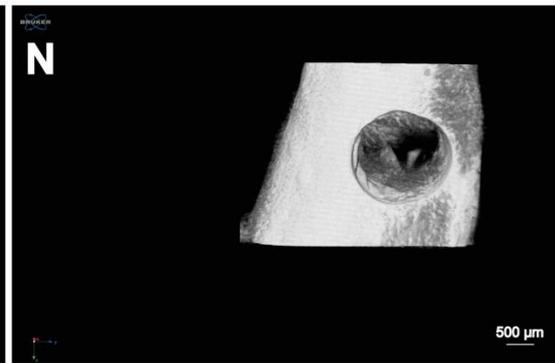
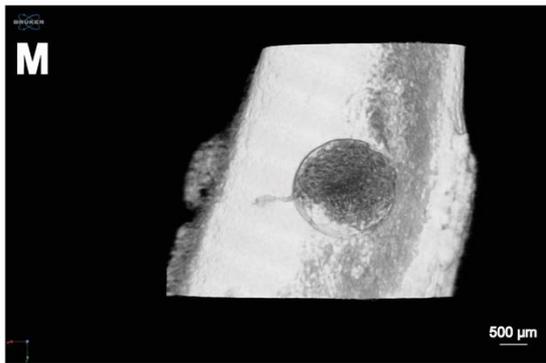


**Figura 16: Reconstrução 3D das tíbias submetidas a defeito ósseo e tratamento por 7 dias com diferentes biocompósitos. (A-D) Colágeno I (mg/mL); (E-H) Colágeno I 2,0 mg/mL + MTA (%); (I-L) Colágeno I 2,0 mg/mL + NTCPM (%); (M) Colágeno I 2,0 mg/mL + MTA 3,2% + NTCPM 0,6%; (N) Coágulo; (O) Carbopol + MTA 3,2% e (P) Carbopol + NTCPM 0,6%.**

Colágeno I 2.0 mg/mL  
+ NTCPM (%)



Col I 2.0 mg/mL + MTA 3.2%  
+ NTCPM 0.6%



Coágulo

Carbopol + MTA 3.2%

Carbopol + NTCPM 0.6%

### **5.2.3.3 Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT da regeneração óssea**

A partir das seções transversais (2D) de cada amostra, a região do defeito ósseo foi selecionada. Posteriormente, foi realizada a análise quantitativa e morfométrica da microtomografia. A análise quantitativa, denominada de “densidade mineral óssea”, foi realizada com o objetivo de determinar a quantidade de mineral existente na área da regeneração do defeito ósseo. Para a análise morfométrica, investigamos o percentual de volume ósseo (razão entre o volume ósseo trabecular pelo volume total do defeito), espessura trabecular (espessura média das trabéculas), separação trabecular (espaço médio entre as trabéculas), número trabecular (número de trabéculas por unidade de comprimento) e índices de conectividade (medida das conexões das trabéculas).

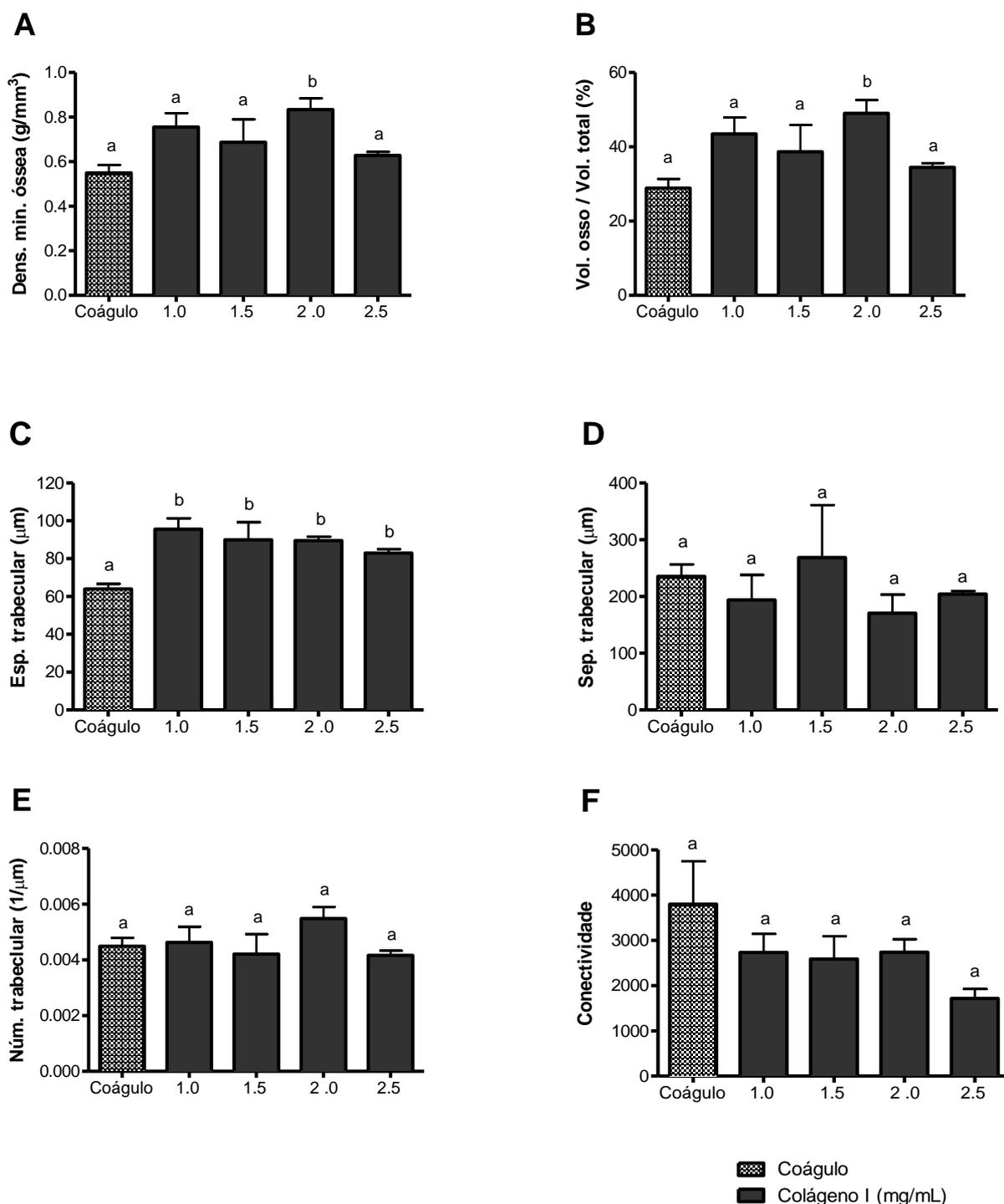
Inicialmente, foram realizadas as análises do grupo colágeno I, cujos resultados são apresentados na Figura 17. A densidade mineral óssea foi significativamente superior na concentração 2,0 mg/mL quando comparada ao coágulo (Figura 17A). A avaliação morfométrica em relação à separação trabecular mostrou equivalência estatística entre todas as concentrações de colágeno I quando comparadas ao coágulo (Figura 17B). A análise do volume ósseo apresentada na Figura 17C demonstrou que a concentração 2,0 mg/mL foi significativamente superior em relação ao coágulo. Os resultados relacionados ao número trabecular, espessura trabecular e conectividade demonstraram não haver diferenças estatísticas das concentrações de colágeno I quando comparadas ao coágulo (Figuras 17D-F).

Os resultados dos tratamentos colágeno I combinado ao MTA e/ou NTCPM são apresentados na Figura 18. Em particular, a densidade mineral óssea (Figura 18A) e o volume ósseo (Figura 18B) de todas as dosagens do grupo colágeno I + MTA (%) testadas foram equivalentes ao coágulo e ao colágeno I e significativamente superiores ao carbopol + MTA 3,2%. Os resultados do grupo colágeno I + NTCPM (%) demonstraram que todas as dosagens avaliadas apresentaram equivalência estatística quando comparados ao coágulo e colágeno I. No entanto, as combinações Col I + NTCPM 1,2% e 2,4% foram significativamente superiores ao controle carbopol + NTCPM 0,6%. A combinação dos três componentes do scaffold (Col I + MTA 3,2% + NTCPM 0,6%) não apresentou ganhos estatísticos comparada às melhores combinações individuais utilizando Col I + MTA 3,2% e Col I + NTCPM 0,6%, e aos controles coágulo, colágeno I e carbopol + NTCPM 0,6%. No entanto, a combinação dos três materiais foi significativamente superior ao carbopol + MTA 3,2%. Novamente esses resultados corroboram aqueles obtidos com a análise morfométrica e reconstrução 2D.

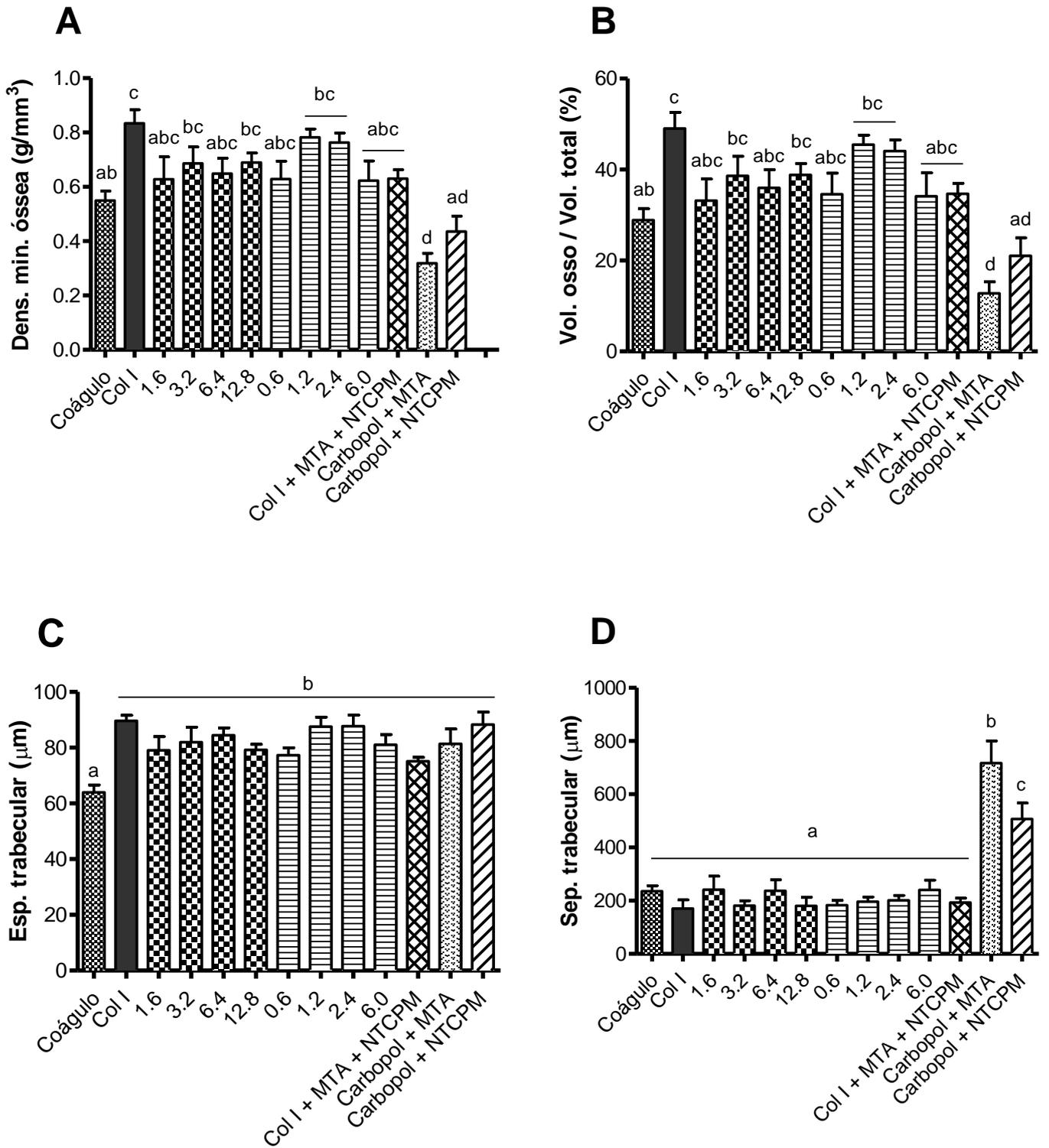
A Figura 18C demonstra que a espessura trabecular de todos os tratamentos foi significativamente superior ao coágulo. A separação trabecular apresentada na Figura 18D demonstrou que os biocompósitos foram significativamente inferiores aos controles carbopol MTA

3,2% e carbopol + NTCPM 0,6%. Entretanto, o número trabecular apresentado na Figura 18E demonstrou que todos os biocompósitos testados e o coágulo foram estatisticamente superiores aos controles carbopol + MTA 3,2% e carbopol + NTCPM 0,6%.

A conectividade entre as trabéculas apresentada na Figura 18F demonstrou que o grupo colágeno I + MTA (%) foi equivalente ao colágeno I e as combinações Col I + MTA 1,6% e 6,4% foram significativamente inferiores ao coágulo. A combinação Col I + NTCPM 0,6% apresentou significativa redução da conectividade quando comparada ao coágulo, porém equivalência ao colágeno I e ao carbopol + NTCPM 0,6%. As demais dosagens do grupo colágeno I + NTCPM (%) e a combinação dos três componentes do biocompósito (Col I + MTA 3,2% + NTCPM 0,6%) apresentaram resultados equivalentes aos controles coágulo, colágeno I e carbopol + NTCPM 0,6%.

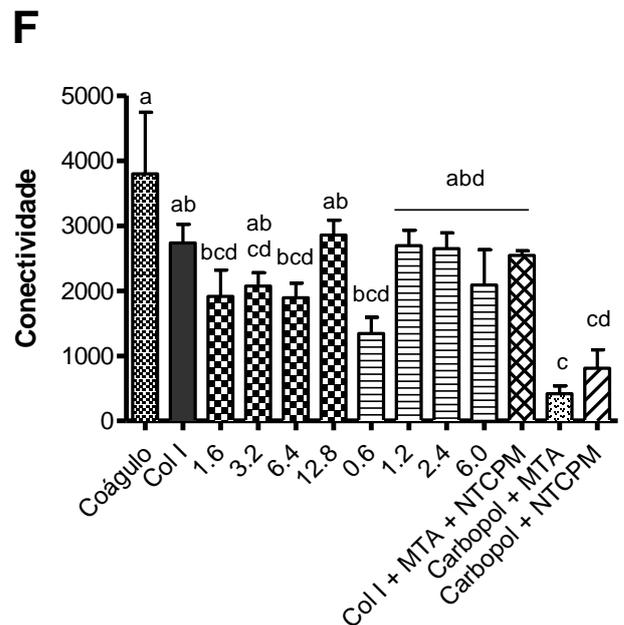
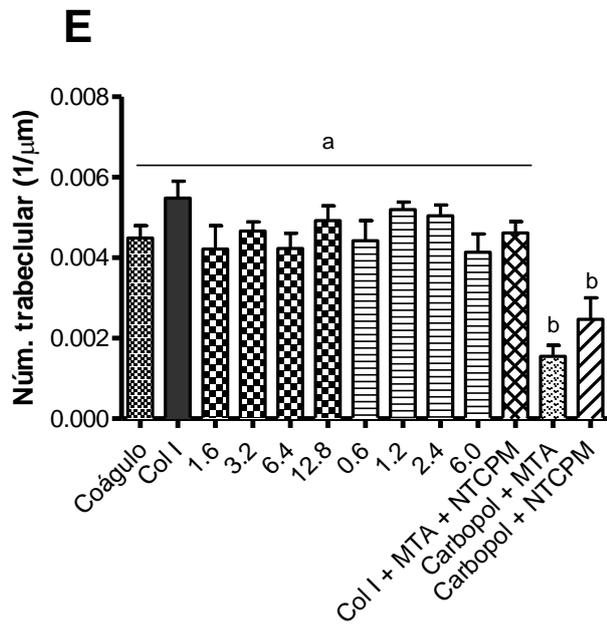


**Figura 17: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT da regeneração óssea após o tratamento de 7 dias com colágeno I em diferentes concentrações. (A) Densidade mineral óssea; (B) Volume ósseo/volume total; (C) Espessura trabecular; (D) Separação trabecular; (E) Número trabecular; (F) Conectividade. Os valores percentuais reportados são expressos como média ± E.P.M. Grupos com pelo menos uma letra em comum apresentam equivalência estatística segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.**



**Figura 18: Análise quantitativa e morfométrica da micro-CT da regeneração óssea após o tratamento de 7 dias com os biocompósitos em diferentes concentrações. (A) Densidade mineral óssea; (B) Volume ósseo/volume total; (C) Espessura trabecular; (D) Separação trabecular; (E) Número trabecular; (F) Conectividade. Os valores percentuais reportados são expressos como média ± E.P.M. Grupos com pelo**

menos uma letra em comum apresentam equivalência estatística segundo one-way ANOVA com  $p < 0.05$  e pós-teste de Newman-Keuls.



- Coágulo
- Col I (2.0 mg/mL)
- Col I + MTA (%)
- Col I + NTCPM (%)
- Col I + MTA 3.2% + NTCPM 0.6%
- Carbopol + MTA 3.2%
- Carbopol + NTCPM 0.6%

## 6. Discussão

O objetivo de vários estudos recentes em engenharia de tecidos é desenvolver um substituto ósseo injetável e moldável, que seja capaz de preencher defeitos ósseos críticos, e que possa ser aplicado *in situ* utilizando métodos cirúrgicos minimamente invasivos (Bose *et al.*, 2012). Uma vez aplicado, esse biocompósito deve formar rapidamente uma estrutura estável e fisiologicamente ativa, a qual irá suportar osteocondução, osteoindução, e osteogênese, e assim reduzir o tempo necessário para que a regeneração óssea ocorra. Estruturas de matriz extracelular ativa de rigidez mecânica definida e contendo proteínas e fatores de crescimento são essenciais para diferenciação celular e a manutenção da maioria dos tecidos, incluindo o osso (Ivanovska *et al.*, 2015). A MEC suporta células que, por sua vez, exercem forças mecânicas sobre a matriz através de contatos célula-MEC. O equilíbrio controlado das forças resultantes de interações célula-MEC tem um papel essencial em diversos processos fisiológicos e patológicos (DuFort *et al.*, 2011; Wirtz *et al.*, 2011), e deve ser considerado no desenvolvimento de estruturas que mimetizam o osso.

O objetivo desta tese foi determinar as concentrações ótimas de colágeno I, MTA, e NTCPM para uso em biocompósitos 3D capazes de manter a viabilidade celular e permitir o crescimento e diferenciação de osteoblastos *in vitro* e *in vivo*. Cada componente do biocompósito foi selecionado em razão de suas propriedades específicas. O colágeno I é a proteína predominante na MEC da maioria dos animais e tem um papel fundamental na regulação da adesão, migração, crescimento e diferenciação celular nos tecidos, incluindo o tecido ósseo. Dada sua interação funcional com as células e suas propriedades mecânicas, além de sua disponibilidade a um custo comparativamente baixo, o colágeno I é geralmente usado como base para a estrutura de biocompósitos. Cabe ressaltar que o colágeno utilizado neste estudo foi preparado usando um método que visa preservar a estrutura nativa de moléculas de colágeno tanto quanto possível.

O MTA, um material comumente usado em odontologia, também tem sido empregado como uma pasta injetável para enxerto ósseo com propriedades osteocondutivas e osteoindutivas reportadas (Ding *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014). Os NTCPMs, por sua vez, demonstraram capacidade de reforçar as propriedades mecânicas de vários biocompósitos (Mikael *et al.*, 2014) e de promover a diferenciação celular (Deligianni 2014; Lin *et al.*, 2014). Nesta tese, verificamos se a inclusão de MTA e/ou NTCPM em um scaffold de colágeno altera a morfologia, viabilidade, e capacidade migratória de osteoblastos, e se alguma das combinações testadas desses componentes melhora a mineralização do scaffold e acelera a regeneração óssea em um sistema vivo.

A caracterização morfológica dos biocompósitos com e sem células foi conduzida utilizando MEV e MET e os resultados observados foram compatíveis com estudos anteriores (MacDonald *et*

*al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). A análise da superfície dos biocompósitos com MEV demonstrou que ambos MTA e NTCPM geralmente aparecem como agregados não homogêneos em associação com fibras de colágeno I. Análises adicionais utilizando MET revelaram agregados, bem como fibrilas individuais de NTCPM, distribuídas por todo o scaffold. Noh *et al.* observaram a presença de agregados distribuídos também em scaffold de álcool polivinil, o que sugere que a formação de agregados seja uma propriedade inerente ao MTA (Noh *et al.*, 2014). Além disso, MacDonald *et al.* observaram estruturas de NTCPS em massas aglomeradas. Observações adicionais não confirmadas também sugeriram que fibras isoladas de NTCPS são encontradas emaranhadas a fibras de colágeno (MacDonald *et al.*, 2005).

Imagens de MEV revelaram que osteoblastos MC3T3-E1 cultivados no biocompósito interagem tanto com a matrix de colágeno quanto com os componentes MTA e NTCPM. Corroborando nossos resultados, estudos anteriores demonstraram que osteoblastos MG63 cultivados em MTA apresentam uma morfologia típica de fibroblastos, com diversas projeções estendidas em direção ao MTA (Attik *et al.*, 2014). Tukat *et al.* estudaram as características morfológicas de osteoblastos primários e células MC3T3-E1 cultivadas em membranas de éster de celulose mistas associadas a NTCPS e observaram que osteoblastos primários retêm adesão celular mesmo após 23 dias (Tutak *et al.*, 2009). Vários estudos demonstraram também a capacidade de células mamárias de endocitar NTC (Tutak *et al.*, 2009; Maruyama *et al.*, 2015), o que corrobora nossa observação de NTCPM dentro do citoplasma de células MC3T3-E1. Embora não tenhamos detectado quaisquer efeitos negativos, não é claro se a presença de pequenas quantidades de NTCPM dentro das células tem efeitos deletérios de longo prazo.

Nossa análise de viabilidade celular revelou uma taxa de sobrevivência de pelo menos 95% para todas as concentrações de colágeno, MTA, e NTCPM após um período de exposição de 48h. Osteoblastos MC3T3-E1 cultivados na maioria das combinações testadas exibiram crescimento satisfatório, atingiram confluência depois de algum tempo e apresentaram numerosas extensões celulares, as quais fizeram contato com outras células ou com o substrato. Entretanto, as células nos scaffolds de colágeno contendo a maior dose de MTA (12,8%), bem como a mistura MTA 6,4% + NTCPM 6,0%, apresentaram morfologia arredondada com poucas projeções celulares. Inicialmente, presumimos que se tratasse de efeitos tóxicos devidos às altas concentrações de MTA e/ou NTCPM, mas estudos de viabilidade demonstraram a normalidade das células. Observamos que, embora células nessas condições sejam viáveis, há menos células presentes, sugerindo que altas concentrações de alguma forma reduzem a proliferação celular. De modo interessante, Deligianni *et al.* mostraram que NTCPM purificados e não-funcionalizados não somente atrasam a proliferação de células tronco mesenquimais, mas também aceleram sua diferenciação em osteoblastos (Deligianni

2014). De fato, observamos que NTCPM 0,6%, a concentração mais baixa testada, causou maiores taxas de mineralização que concentrações de NTCPM entre 1,2 e 6,0%. Além disso, houve maior taxa de mineralização em um scaffold contendo uma combinação de NTCPM 1,2% + MTA 3,2% que em scaffolds contendo apenas um desses componentes (Figura 12), o que sugere que haja um efeito aditivo nas misturas de NTCPM e MTA. Estudos futuros com base em várias concentrações e combinações de NTCPM e MTA verificarão não somente a capacidade de proliferação e mineralização dos osteoblastos, mas também a expressão de marcadores de diferenciação óssea, como osteopontina, osteocalcina e fosfatase alcalina.

A capacidade de scaffolds rígidos de promoverem adesão celular, migração e colonização homogênea é diretamente relacionada ao tamanho e interconectividade de seus poros (Misra *et al.*, 2010; Chatzinikolaidou *et al.*, 2014). Por outro lado, a migração em scaffolds de colágenos nativos, não-reticulados é mais dependente da densidade das fibras de colágeno: as células podem se espremer dentre as fibras flexíveis, ao menos até certa densidade (concentração de colágeno), ou podem secretar enzimas que degradam o colágeno e permitem sua passagem. Observamos que os osteoblastos foram capazes de migrar eficientemente em scaffolds contendo concentrações de colágeno entre 1,75 e 3,0 mg/mL, enquanto altas concentrações (i.e., rigidez aumentada) correlacionaram-se com uma diminuição da migração. Surpreendentemente, a combinação de colágeno I com MTA resultou em um aumento da eficiência migratória. Se isso é devido a um efeito do MTA sobre as células ou sobre o scaffold de colágeno ainda não foi determinado. No entanto, é importante notar que estudos observaram que o MTA inibe a diferenciação de osteoclastos através da manutenção da expressão de osteoprotegerina em osteoblastos, e assim inibir a reabsorção óssea osteoclástica (Hashiguchi *et al.*, 2010; Hashiguchi *et al.*, 2011).

Misturas de colágeno I e NTCPM não apresentaram eficiências migratórias diferentes do controle. Embora a combinação de todos os três componentes (colágeno I + MTA + NTCPM) tenha proporcionado uma maior migração celular que o colágeno puro ou colágeno I + NTCPM (Figura 11), o nível foi inferior ao de colágeno I + MTA, indicando que a presença de NTCPM causa um declínio no número de células migratórias. Conforme discutido anteriormente (Deligianni 2014), pode ser que NTCPM acelere a diferenciação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 em osteoblastos maduros e imóveis.

O estudo *in vitro* demonstrou que substitutos ósseos produzidos por meio da incorporação de MTA e/ou NTCPM em scaffolds de colágeno I suportam a viabilidade, migração e potencializam a mineralização. Posteriormente, para melhor caracterizar biologicamente os biocompósitos, decidimos avaliar o comportamento dos scaffolds na regeneração óssea de tíbias de ratos submetidos a defeito ósseo no período de 7 dias. Observamos nas análises histomorfométricas que a

concentração colágeno I 2,0 mg/mL apresentou duas vezes mais a taxa de formação de osso trabecular em relação ao controle coágulo. No entanto, as mistura de colágeno I e MTA não apresentaram resultados superiores ao colágeno I puro, demonstrando que o MTA parece não ter apresentado efeito sobre o colágeno I na regeneração óssea. Por outro lado, as taxas de formação de osso trabecular nas concentrações NTCPM entre 1,2 e 6,0% foram inferiores ao colágeno I, sendo apenas a concentração mais baixa de NTCPM 0,6%, semelhante ao colágeno I. Além disso, a combinação Col I + NTCPM 1,2% + MTA 3,2% apresentou resultado semelhante ao colágeno I puro e aos scaffolds contendo os componentes individuais (Figura 14), o que sugere que MTA e NTCPM misturados ao colágeno I não apresentaram efeito aditivo na regeneração óssea. Para confirmar esse dado, avaliamos o efeito individual do MTA 3,2% e NTCPM 0,6% misturados ao carbopol e os resultados apresentaram equivalência ao coágulo na formação de osso trabecular. Portanto, os resultados dos controles carbopol sugerem que nas dosagens testadas, o MTA e NTCPM individuais não apresentam efeito sobre a regeneração óssea do defeito ósseo.

Embora não existam trabalhos na literatura que demonstrem a atividade do biocompósito proposto nesta tese, é possível avaliar a atividade de alguns componentes em outro cenário. Assim, na literatura, encontram-se inúmeros trabalhos demonstrando o uso de MTA na sua forma nativa de cimento endodôntico, lembrando uma consistência do tipo “pasta”, diferente da formulação proposta nesta tese. De fato, o MTA apresenta excelentes resultados na neoformação óssea e inúmeros grupos de pesquisa buscam melhorar suas propriedades físico-químicas sem resultar no detrimento de suas propriedades biológicas. Um estudo para avaliação do processo de reparo de defeito ósseo em calvária de ratos tratados com MTA, fosfato de cálcio bifásico ou a combinação dos dois, mostrou que o MTA puro apresentou maior quantidade de tecido osteóide e maior área de formação de tecido ósseo em relação à associação com o fosfato de cálcio (Silva *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* e *in vivo* conduzidos por Lobo *et al.* demonstraram que a associação de nanocompósito à base de nano-hidroxiapatita e MWCNT (nHAp/VAMWCNT-O<sub>2</sub>) promoveu a adesão e calcificação da matriz extracelular quando em cultivo com osteoblastos humanos. Além disso, resultados histológicos desse estudo demonstraram que a associação desse nanocompósito induziu a formação de osso lamelar maduro em defeitos de calvária de camundongos sem desencadear reação inflamatória (Lobo *et al.*, 2013).

Embora a histomorfometria seja uma excelente técnica de análise da regeneração tecidual óssea, as microtomografias são bastante utilizadas, devido ao fato de obter imagens com seções transversais, modelos da estrutura em 3D e realização de cálculos morfométricos com precisão. A densidade mineral óssea do colágeno I 2,0 mg/mL foi superior em relação as demais concentrações. No entanto, as misturas de colágeno I e MTA não apresentaram diferenças ao colágeno I puro em

relação à densidade mineral óssea e, de forma contrária a histomorfometria, o grupo NTCPM não apresentou resultados inferiores ao colágeno I puro. O volume ósseo em relação ao volume total do defeito assim como a conectividade mostrou que todos os biocompósitos analisados foram equivalentes ao colágeno I puro, mas os controles carbopol MTA e NTCPM foram inferiores. Corroborando nossos resultados, Santos et al. demonstraram em análise de microCT que esponjas de colágeno I porcino aumentaram aproximadamente duas vezes o volume ósseo em defeitos de calvária de ratos em comparação ao coágulo em um período de oito semanas de tratamento (Santos Tde *et al.*, 2015).

A espessura trabecular foi superior em todos os tratamentos incluindo os controles carbopol MTA e NTCPM em relação ao coágulo, e não diferiram do colágeno I. No entanto, a separação trabecular das tíbias tratadas com os biocompósitos foi equivalente ao coágulo, exceto as tíbias tratadas com os controles carbopol, que demonstraram maior separação entre as trabéculas ósseas. O número trabecular das tíbias tratadas com os biocompósitos foi equivalente ao coágulo, porém, superiores aos controles carbopol. As análises do MTA e NTCPM combinados ao carbopol sugerem que esses materiais individualizados parecem não induzir a regeneração óssea e, quando combinados ao colágeno I, também não potencializam a ação que o colágeno I puro exerce na regeneração tecidual. Esses resultados levantam duas hipóteses para investigação futura: (1) o tempo de regeneração óssea pode ter sido insuficiente, o que sugere a avaliação de tempos mais longos; (2) as concentrações de MTA e NTCPM podem ter sido baixas para o estudo *in vivo*, uma vez que o biocompósito mistura-se ao sangue e sofre diluição, sugerindo a avaliação de doses mais elevadas.

Como demonstrado neste trabalho, o biocompósito composto por colágeno I, MTA e NTCPM apresenta características importantes relacionadas ao reparo ósseo. Embora os resultados *in vivo* no tempo avaliado não demonstraram diferenças dos biocompósitos em relação ao colágeno I puro, os dados *in vitro* demonstraram resultados promissores sobre o efeito da combinação do colágeno I, MTA e NTCPM na regeneração do tecido ósseo.

## 7. Conclusões

Nossas conclusões são:

1. A análise da superfície dos biocompósitos com MEV demonstrou que ambos MTA e NTCPM aparecem como agregados não homogêneos em associação com fibras de colágeno I.
2. Osteoblastos MC3T3-E1 cultivados no biocompósito interagem tanto com a matriz de colágeno quanto com os componentes MTA e NTCPM e, particularmente, osteoblastos foram capazes de endocitar NTCPMs que apareceram dispersos no citoplasma ou detidos em vesículas citoplasmáticas.
3. O estudo de viabilidade celular apresentou taxa de sobrevivência de pelo menos 95% para todas as concentrações de colágeno, MTA, e NTCPM após um período de exposição de 48h. Embora a viabilidade celular seja alta, há menos células presentes, sugerindo que altas concentrações de alguma forma reduzem a proliferação celular.
4. Os NTCPMs 0.6%, a concentração mais baixa testada, causaram maiores taxas de mineralização que concentrações de NTCPM entre 1,2 e 6,0%. Além disso, houve maior taxa de mineralização em um scaffold contendo uma combinação de NTCPM 1,2% + MTA 3,2% que em scaffolds contendo apenas um desses componentes, sugerindo que haja um efeito aditivo nas misturas de NTCPM e MTA.
5. Osteoblastos foram capazes de migrar de forma eficiente em biocompósitos contendo concentrações de colágeno entre 1,75 e 3,0 mg/mL, enquanto altas concentrações correlacionaram-se com uma diminuição da migração. Surpreendentemente, a combinação de colágeno I com MTA resultou em um aumento da eficiência migratória. De forma contrária, misturas de colágeno I e NTCPM não apresentaram eficiências migratórias diferentes da do controle. Embora a combinação de todos os três componentes (colágeno I + MTA + NTCPM) tenha proporcionado uma maior migração celular que o colágeno puro ou colágeno I + NTCPM, o nível foi inferior ao de colágeno I + MTA, indicando que a presença de NTCPM causa um declínio no número de células migrantes.
6. Os resultados *in vivo* demonstraram que colágeno I 2,0 mg/mL foi capaz de aumentar a regeneração óssea no período de 7 dias. No entanto, as misturas de MTA e/ou NTCPM ao colágeno I não apresentaram efeitos aditivos ao colágeno I.

## 8. Referências

- Ajayan PM. 1999, Nanotubes from Carbon, *Chem Rev*, **99**:7 1787-1800
- Akkouch A, Zhang Z, Rouabhia M. 2011, A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co-epsilon-caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration, *J Biomed Mater Res A*, **96**:4 693-704
- AlGhamdi AS, Shibly O, Ciancio SG. 2010, Osseous grafting part II: xenografts and alloplasts for periodontal regeneration-a literature review, *J Int Acad Periodontol*, **12**:2 39-44
- Almeida TCS (2013). Avaliação dos Parâmetros Funcionais e Estruturais Renais de Ratos Tratados com Biocompósitos Baseados em Nanotubos de Carbono Departamento de Morfologia. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. **Dissertação de mestrado**: 89 páginas.
- Antoine EE, Vlachos PP, Rylander MN. 2014, Review of collagen I hydrogels for bioengineered tissue microenvironments: characterization of mechanics, structure, and transport, *Tissue Eng Part B Rev*, **20**:6 683-96
- Arakawa C, Ng R, Tan S, Kim S, Wu B, Lee M. 2014, Photopolymerizable chitosan-collagen hydrogels for bone tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med*,
- Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, Colon P, Grosogeat B. 2014, In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA((R)), *Int Endod J*, **47**:12 1133-41
- Baek SH, Plenk H, Jr., Kim S. 2005, Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials, *J Endod*, **31**:6 444-9
- Benoit DS, Schwartz MP, Durney AR, Anseth KS. 2008, Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells, *Nat Mater*, **7**:10 816-23
- Bertazzo S, Zambuzzi WF, Campos DD, Ogeda TL, Ferreira CV, Bertran CA. 2010, Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion, *Colloids Surf B Biointerfaces*, **78**:2 177-84
- Bhattacharyya S, Guillot S, Dabboue H, Tranchant JF, Salvétat JP. 2008, Carbon nanotubes as structural nanofibers for hyaluronic acid hydrogel scaffolds, *Biomacromolecules*, **9**:2 505-9
- Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. 2012, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol*, **30**:10 546-54
- Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J. 1990, Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture, *Calcif Tissue Int*, **46**:1 46-56
- Castillo AB, Leucht P. 2015, Bone Homeostasis and Repair: Forced Into Shape, *Curr Rheumatol Rep*, **17**:9 537
- Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. 2003, Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats, *J Periodontal Res*, **38**:2 223-6
- Chatzinikolaidou M, Rekstyte S, Danilevicius P, Pontikoglou C, Papadaki H, Farsari M, Vamvakaki M. 2014, Adhesion and growth of human bone marrow mesenchymal stem cells on precise-geometry 3D organic-inorganic composite scaffolds for bone repair, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **48**:301-9
- Corral Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. 2014, Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line, *J Endod*, **40**:3 406-11
- de Oliveira RC, de Oliveira FH, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. 2008, Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria, *Clin Oral Implants Res*, **19**:8 749-54

- Deligianni DD. 2014, Multiwalled carbon nanotubes enhance human bone marrow mesenchymal stem cells' spreading but delay their proliferation in the direction of differentiation acceleration, *Cell Adh Migr*, **8**:6 558-62
- Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. 2009, The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model, *Dent Mater J*, **28**:4 396-400
- Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. 2002, Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen, *J Biol Chem*, **277**:6 4223-31
- Ding SJ, Shie MY, Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G, Chang HC. 2010, Osteogenic differentiation and immune response of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on injectable calcium-silicate-based bone grafts, *Tissue Eng Part A*, **16**:7 2343-54
- DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. 2011, Balancing forces: architectural control of mechanotransduction, *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**:5 308-19
- Eatemadi A, Daraee H, Karimkhanloo H, Kouhi M, Zarghami N, Akbarzadeh A, Abasi M, Hanifehpour Y, Joo SW. 2014, Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications, *Nanoscale Res Lett*, **9**:1 393
- Ehrler DM, Vaccaro AR. 2000, The use of allograft bone in lumbar spine surgery, *Clin Orthop Relat Res*, 371 38-45
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. 2015, Fracture healing: mechanisms and interventions, *Nat Rev Rheumatol*, **11**:1 45-54
- Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. 2015, Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration, *Bone*, **81**:112-121
- Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KB, Granjeiro JM, de Oliveira RC, Zambuzzi WF. 2014, Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface, *Arch Biochem Biophys*, **561**:88-98
- Guillame-Gentil O, Semenov O, Roca AS, Groth T, Zahn R, Voros J, Zenobi-Wong M. 2010, Engineering the extracellular environment: Strategies for building 2D and 3D cellular structures, *Adv Mater*, **22**:48 5443-62
- Gulan G, Jotanovic Z, Jurdana H, Sestan B, Rapan S, Rubinic D, Ravlic-Gulan J. 2012, Treatment of infected tibial nonunion with bone defect using central bone grafting technique, *Coll Antropol*, **36**:2 617-21
- Gupta A, Woods MD, Illingworth KD, Niemeier R, Schafer I, Cady C, Filip P, El-Amin SF, 3rd. 2013, Single walled carbon nanotube composites for bone tissue engineering, *J Orthop Res*, **31**:9 1374-81
- Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, Belli S. 2009, Effects of mineral trioxide aggregate on cell survival, gene expression associated with mineralized tissues, and biomineralization of cementoblasts, *J Endod*, **35**:4 513-9
- Hashiguchi D, Fukushima H, Nakamura M, Morikawa K, Yasuda H, Udagawa N, Maki K, Jimi E. 2010, Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts, *J Biomed Mater Res A*, **96**:2 358-64
- Hashiguchi D, Fukushima H, Yasuda H, Masuda W, Tomikawa M, Morikawa K, Maki K, Jimi E. 2011, Mineral trioxide aggregate inhibits osteoclastic bone resorption, *J Dent Res*, **90**:7 912-7
- Iijima S. 1991, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature*, **354**:56-58
- Ivanovska IL, Shin JW, Swift J, Discher DE. 2015, Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow, *Trends Cell Biol*, **25**:9 523-32
- Karageorgiou V, Kaplan D. 2005, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, **26**:27 5474-91
- Kinoshita S, Finnegan M, Bucholz RW, Mizuno K. 1999, Three-dimensional collagen gel culture promotes osteoblastic phenotype in bone marrow derived cells, *Kobe J Med Sci*, **45**:5 201-11

- Kitten GT, Kolker SJ, Krob SL, Klewer SE. 1996, Type VI collagen in the cardiac valves and connective tissue septa during heart development, *Braz J Med Biol Res*, **29**:9 1189-93
- Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. 1997, Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts, *J Biomed Mater Res*, **37**:3 432-9
- Kurdy NM, Weiss JB, Bate A. 1996, Endothelial stimulating angiogenic factor in early fracture healing, *Injury*, **27**:2 143-5
- Lane JM, Sandhu HS. 1987, Current approaches to experimental bone grafting, *Orthop Clin North Am*, **18**:2 213-25
- Lee FY, Choi YW, Behrens FF, DeFouw DO, Einhorn TA. 1998, Programmed removal of chondrocytes during endochondral fracture healing, *J Orthop Res*, **16**:1 144-50
- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. 1993, Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations, *J Endod*, **19**:11 541-4
- Lin B, Zhou H, Leaman DW, Goel VK, Agarwal AK, Bhaduri SB. 2014, Sustained release of small molecules from carbon nanotube-reinforced monetite calcium phosphate cement, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, **43**:92-6
- Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. 1996, Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP, *Bone*, **19**:1 Suppl 1S-12S
- Lobo AO, Siqueira IA, das Neves MF, Marciano FR, Corat EJ, Corat MA. 2013, In vitro and in vivo studies of a novel nanohydroxyapatite/superhydrophilic vertically aligned carbon nanotube nanocomposites, *J Mater Sci Mater Med*, **24**:7 1723-32
- MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. 2005, Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, **74**:3 489-96
- Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. 2010, Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells, *J Endod*, **36**:4 647-52
- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. 2007, Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study, *Tissue Eng*, **13**:5 947-55
- Martins-Junior PA, Alcantara CE, Resende RR, Ferreira AJ. 2013, Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine, *J Dent Res*, **92**:7 575-83
- Maruyama K, Haniu H, Saito N, Matsuda Y, Tsukahara T, Kobayashi S, Tanaka M, Aoki K, Takanashi S, Okamoto M, Kato H. 2015, Endocytosis of Multiwalled Carbon Nanotubes in Bronchial Epithelial and Mesothelial Cells, *Biomed Res Int*, **2015**:793186
- Melnyk M, Henke T, Claes L, Augat P. 2008, Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury, *Arch Orthop Trauma Surg*, **128**:10 1159-65
- Mikael PE, Amini AR, Basu J, Josefina Arellano-Jimenez M, Laurencin CT, Sanders MM, Barry Carter C, Nukavarapu SP. 2014, Functionalized carbon nanotube reinforced scaffolds for bone regenerative engineering: fabrication, in vitro and in vivo evaluation, *Biomed Mater*, **9**:3 035001
- Misra SK, Ansari TI, Valappil SP, Mohn D, Philip SE, Stark WJ, Roy I, Knowles JC, Salih V, Boccaccini AR. 2010, Poly(3-hydroxybutyrate) multifunctional composite scaffolds for tissue engineering applications, *Biomaterials*, **31**:10 2806-15
- Naik RM, Pudukalkatti PS, Hattarki SA. 2014, Can MTA be: Miracle trioxide aggregate?, *J Indian Soc Periodontol*, **18**:1 5-8
- Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF, Penninger JM, Takayanagi H. 2011, Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression, *Nat Med*, **17**:10 1231-4
- Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H. 2011, Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D, *Nat Med*, **17**:11 1473-80

- Negishi-Koga T, Takayanagi H. 2012, Bone cell communication factors and Semaphorins, *Bonekey Rep*, **1**:183
- Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. 1997, Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone, *Bone*, **20**:3 273-82
- Noh YS, Chung SH, Bae KS, Baek SH, Kum KY, Lee WC, Shon WJ, Rhee SH. 2014, Mechanical properties and microstructure analysis of mineral trioxide aggregate mixed with hydrophilic synthetic polymer, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,
- Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. 2014, Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions, *J Orthop Surg Res*, **9**:1 18
- Parirokh M, Torabinejad M. 2010, Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- Part I: chemical, physical, and antibacterial properties, *J Endod*, **36**:1 16-27
- Parirokh M, Torabinejad M. 2010, Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-- Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action, *J Endod*, **36**:3 400-13
- Peng F, Olson JR, Shaw MT, Wei M. 2009, Influence of pretreatment on the surface characteristics of PLLA fibers and subsequent hydroxyapatite coating, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **88**:1 220-9
- Phan TC, Xu J, Zheng MH. 2004, Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease, *Histol Histopathol*, **19**:4 1325-44
- Phillips AM. 2005, Overview of the fracture healing cascade, *Injury*, **36 Suppl 3**:S5-7
- Plotkin LI. 2014, Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption, *Curr Osteoporos Rep*, **12**:1 121-6
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006, Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling, *Annu Rev Biomed Eng*, **8**:455-98
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL. 2010, Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue, *Osteoporos Int*, **21**:9 1457-69
- Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. 2013, Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering, *Clin Cases Miner Bone Metab*, **10**:3 155-61
- Sa MA, Andrade VB, Mendes RM, Caliarri MV, Ladeira LO, Silva EE, Silva GA, Correa-Junior JD, Ferreira AJ. 2013, Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets, *Oral Dis*, **19**:5 484-93
- Salgado CL, Grenho L, Fernandes MH, Colaco BJ, Monteiro FJ. 2015, Biodegradation, biocompatibility, and osteoconduction evaluation of collagen-nanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration, *J Biomed Mater Res A*,
- Santos Tde S, Abuna RP, Almeida AL, Beloti MM, Rosa AL. 2015, Effect of collagen sponge and fibrin glue on bone repair, *J Appl Oral Sci*, **23**:6 623-8
- Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. 2005, Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate, *J Endod*, **31**:2 97-100
- Schor SL, Schor AM, Winn B, Rushton G. 1982, The use of three-dimensional collagen gels for the study of tumour cell invasion in vitro: experimental parameters influencing cell migration into the gel matrix, *Int J Cancer*, **29**:1 57-62
- Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. 2005, Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **74**:2 782-8
- Shapiro IM, Layfield R, Lotz M, Settembre C, Whitehouse C. 2014, Boning up on autophagy: the role of autophagy in skeletal biology, *Autophagy*, **10**:1 7-19
- Shibuya N, Jupiter DC. 2015, Bone graft substitute: allograft and xenograft, *Clin Podiatr Med Surg*, **32**:1 21-34
- Silva EE, Colleta HHMD, Ferlauto AS, Moreira RL, Resende RR, Oliveira S, Kitten GT, Lacerda RG, Ladeira LO. 2009, Nanostructured 3-D collagen/ nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds, *Nano Res*, **2**:462-473

- Silva GA, Caliaro MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. 2010, Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair, *Life Sci*, **87**:7-8 215-22
- Silva LG, Kim SH, Luczyszyn SM, Papalexiou V, Giovanini A, Almeida LE, Tramontina VA. 2014, Histological and immunohistochemical evaluation of biphasic calcium phosphate and a mineral trioxide aggregate for bone healing in rat calvaria, *Int J Oral Maxillofac Surg*, **44**:4 535-42
- Sims NA, Gooi JH. 2008, Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption, *Semin Cell Dev Biol*, **19**:5 444-51
- Spin-Neto R, Landazuri Del Barrio RA, Pereira LA, Marcantonio RA, Marcantonio E, Marcantonio E, Jr. 2013, Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction, *Clin Implant Dent Relat Res*, **15**:4 490-7
- Stevens MM, George JH. 2005, Exploring and engineering the cell surface interface, *Science*, **310**:5751 1135-8
- Thein-Han W, Xu HH. 2011, Collagen-calcium phosphate cement scaffolds seeded with umbilical cord stem cells for bone tissue engineering, *Tissue Eng Part A*, **17**:23-24 2943-54
- Tonelli FM, Santos AK, Gomes KN, Lorencon E, Guatimosim S, Ladeira LO, Resende RR. 2012, Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering, *Int J Nanomedicine*, **7**:4511-29
- Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. 1995, Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs, *J Endod*, **21**:12 603-8
- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. 1995, Physical and chemical properties of a new root-end filling material, *J Endod*, **21**:7 349-53
- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. 1995, Antibacterial effects of some root end filling materials, *J Endod*, **21**:8 403-6
- Torabinejad M, Pariookh M. 2010, Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations, *J Endod*, **36**:2 190-202
- Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. 1997, Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys, *J Endod*, **23**:4 225-8
- Tran PA, Zhang L, Webster TJ. 2009, Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine, *Adv Drug Deliv Rev*, **61**:12 1097-114
- Trigueiro JP, Silva GG, Lavall RL, Furtado CA, Oliveira S, Ferlauto AS, Lacerda RG, Ladeira LO, Liu JW, Frost RL, George GA. 2007, Purity evaluation of carbon nanotube materials by thermogravimetric, TEM, and SEM methods, *J Nanosci Nanotechnol*, **7**:10 3477-86
- Tutak W, Park KH, Vasilov A, Starovoytov V, Fanchini G, Cai SQ, Partridge NC, Sesti F, Chhowalla M. 2009, Toxicity induced enhanced extracellular matrix production in osteoblastic cells cultured on single-walled carbon nanotube networks, *Nanotechnology*, **20**:25 255101
- Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. 2008, Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects, *Small*, **4**:2 240-6
- Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. 2000, Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo, *J Bone Miner Res*, **15**:1 60-7
- Villa MM, Wang L, Huang J, Rowe DW, Wei M. 2014, Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **103**:2 243-53
- Wang Y, Yan M, Fan Z, Ma L, Yu Y, Yu J. 2014, Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF-kappaB pathway, *Oral Dis*, **20**:7 650-8

- Wirtz D, Konstantopoulos K, Searson PC. 2011, The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis, *Nat Rev Cancer*, **11**:7 512-22
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. 2004, Focal adhesion regulation of cell behavior, *Biochim Biophys Acta*, **1692**:2-3 103-19
- Xia Z, Yu X, Jiang X, Brody HD, Rowe DW, Wei M. 2013, Fabrication and characterization of biomimetic collagen-apatite scaffolds with tunable structures for bone tissue engineering, *Acta Biomater*, **9**:7 7308-19
- Yadav SK, Bera T, Saxena PS, Maurya AK, Garbyal RS, Vajtai R, Ramachandrarao P, Srivastava A. 2010, MWCNTs as reinforcing agent to the hap-gel nanocomposite for artificial bone grafting, *J Biomed Mater Res A*, **93**:3 886-96
- Yan XZ, Yang W, Yang F, Kersten-Niessen M, Jansen JA, Both SK. 2013, Effects of continuous passaging on mineralization of MC3T3-E1 cells with improved osteogenic culture protocol, *Tissue Eng Part C Methods*, **20**:3 198-204
- Yu X, Wang L, Peng F, Jiang X, Xia Z, Huang J, Rowe D, Wei M. 2013, The effect of fresh bone marrow cells on reconstruction of mouse calvarial defect combined with calvarial osteoprogenitor cells and collagen-apatite scaffold, *J Tissue Eng Regen Med*, **7**:12 974-83
- Yunoki S, Sugiura H, Ikoma T, Kondo E, Yasuda K, Tanaka J. 2011, Effects of increased collagen-matrix density on the mechanical properties and in vivo absorbability of hydroxyapatite-collagen composites as artificial bone materials, *Biomed Mater*, **6**:1 015012
- Zaman MH, Trapani LM, Sieminski AL, Mackellar D, Gong H, Kamm RD, Wells A, Lauffenburger DA, Matsudaira P. 2006, Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:29 10889-94
- Zambuzzi WF, Fernandes GV, Iano FG, Fernandes Mda S, Granjeiro JM, Oliveira RC. 2012, Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects, *Braz Dent J*, **23**:4 315-21
- Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. 2006, Bone cell proliferation on carbon nanotubes, *Nano Lett*, **6**:3 562-7