

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de pós graduação em Biologia Celular

Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros

AVALIAÇÃO DE MODULADORES E BIOMATERIAIS PARA APLICAÇÕES EM
AFECÇÕES DO TECIDO ÓSSEO

Belo Horizonte

2021

Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros

**AVALIAÇÃO DE MODULADORES E BIOMATERIAIS PARA APLICAÇÕES EM
AFECÇÕES DO TECIDO ÓSSEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Érika Lorena
Fonseca Costa de Alvarenga

Belo Horizonte
Março/2021

043 Medeiros, Rebecca Vasconcellos Botelho de.
Avaliação de moduladores e biomateriais para aplicações em afecções do tecido ósseo [manuscrito] / Rebecca Vasconcellos Botelho de Medeiros. – 2021. 229 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende. Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Osso e Ossos. 3. Osteoporose. 4. Materiais Biocompatíveis. 5. Nanocompostos. 6. Titânio. I. Resende, Rodrigo Ribeiro. II. Alvarenga, Érika Lorena Fonseca Costa de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



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

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE
REBECCA VASCONCELLOS BOTELHO DE
MEDEIROS**

233/2021
entrada
1º/2016
2016705935

Às **treze horas e trinta minutos** do dia **31 de março de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AVALIAÇÃO DE MODULADORES E BIOMATERIAIS PARA APLICAÇÕES EM AFECÇÕES DO TECIDO ÓSSEO**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dra. Erika Lorena F. C. de Alvarenga**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Lorena F. C. de Alvarenga	UFSJ	Aprovada
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovada
Dr. Marcos Augusto de Sá	UFMG	Aprovada
Dra. Michele Munk Pereira	UFJF	Aprovada
Dr. Álvaro César de Oliveira Penoni	UFSJ	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **Aprovada**.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 31 de março de 2021.**

Dr^a. Erika Lorena F. C. de Alvarenga (Coorientadora)

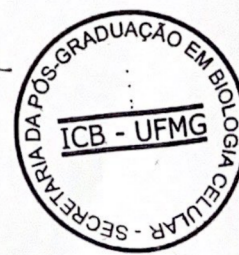
Dr^a. Erika Cristina Jorge

Dr. Marcos Augusto de Sá

Dr^a. Michele Munk Pereira

Dr. Álvaro César de Oliveira Penoni

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Dedico este trabalho ao meu filho Marcos III,
meu maior amor e meu maior estímulo a querer
ser sempre melhor

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter iluminado meu caminho e ter me dado força para enfrentar mais um desafio.

Ao meu filho, a quem dedico todo este trabalho. Foi somente por você que encarei mais esse desafio

Ao meu companheiro, Marcos, por me entender, por seus esforços durante esse período e principalmente por me aturar nesse período.

Aos meus pais, Fernanda e Marcelos, por todo o apoio, principalmente com a chegada do Marquinho. Sem o apoio de vocês, eu não teria finalizado este trabalho.

Ao meu afilhado Jair, pela ajuda nessa reta final do doutorado.

À toda a minha família.

Ao querido amigo Nathanael, por estar sempre ao meu lado, dividindo experiências e muitos momentos de distração, além de estar sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos formados em BH por dividir problemas e experiências em todos esses dias de convívio. Em especial, ao Anderson, que sempre está disposto a compartilhar seus conhecimentos, a Swiany pelas conversas e conselhos e a Nicole, por estar sempre bem humorada e disposta a ajudar.

Ao querido Jamil e sua esposa Jaqueline, por serem sempre prestativos e nos ajudar em simplesmente tudo. Obrigada pelos momentos de “Happy Hours”, sem eles eu enlouqueceria.

Aos amigos da UFJF que me auxiliaram durante minha licença maternidade, principalmente a Leonara, sempre prestativa e educada. Ao Elyabe, que sempre esteve à disposição, mesmo durante o período da pandemia. Obrigada a todos.

À profa. Dra. Priscila Faria, que me abriu as portas do seu laboratório, sempre disposta a me ajudar e solidária à minha causa. A técnica Raíssa, meu muito obrigada.

À profa. Dra. Samyra Nassif pelo auxílio no final do doutorado e a todos os membros do seu laboratório que me trataram super bem neste período e foram super atenciosos. Em especial a técnica Mara por me auxiliar em todos os trâmites necessários durante este período de pandemia.

À todos os laboratórios, tanto na UFMG quanto na UFJF, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao diretor do centro de bioterismo (CEBIO) do ICB da UFMG, sempre educado e prestativo, me auxiliando nas pesquisas com os camundongos.

À Profa. Dra. Roseli Marins Balestra e ao Francis Goulart pela confiança depositada em mim e pelas recentes colaborações.

À Profa. Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas, à Talita Bárbara Gontijo e ao Wallace Júnio Reis pelas trocas, pela confiança e pelas recentes colaborações.

À Profa. Dra. Érika Alvarenga por compartilhar suas experiências e ser sempre prestativa e preocupada em me auxiliar. Obrigada por todas as oportunidades oferecidas, todo o conhecimento compartilhado e pela parceria estabelecida. Obrigada por não ter desistido, apesar de todos os desafios durante esses 4 anos de doutorado.

À Profa. Dra. Michele Munk que me abriu as portas do seu laboratório, possibilitando que eu terminasse esse trabalho próximo ao meu filho. Obrigada pela confiança e por compartilhar sua experiência e seus conhecimentos durante esse período de colaboração.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Resende, pelas oportunidades oferecidas.

Em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da UFMG e ao colegiado por apoiar seus alunos nos momentos necessários.

À Capes pelo apoio financeiro.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Resumo

No Brasil, a osteoporose acomete cerca de 10 milhões de pessoas. Embora haja muitos fármacos já comercializados para o tratamento da osteoporose, os pesquisadores ainda buscam um fármaco mais eficiente, com menores efeitos colaterais e que necessite de doses menores das já administradas. Além disso, a regeneração óssea é um aspecto da biologia em constante investigação e palco para recentes pesquisas envolvendo produtos terapêuticos e desenvolvimento de alternativas para o restabelecimento de fraturas. Neste contexto, a nanobiotecnologia ganha destaque e está sendo diretamente aplicada no desenvolvimento de implantes e suportes para culturas celulares. Pesquisas voltadas para o reparo de fraturas buscam desenvolver materiais bioativos capazes de estabelecer uma comunicação entre o material e o tecido celular, auxiliando a formação dos vasos sanguíneos e acelerando o reparo ósseo. As ligas de titânio, por exemplo, vêm sofrendo modificações em sua composição e superfície visando a melhoria dos implantes. Além disso, materiais biológicos, como órgãos descelularizados, têm ganhado destaque no mercado de implantes, servindo de suportes celulares para futuros implantes. Dito isso, o objetivo deste trabalho foi estudar estratégias terapêuticas farmacológicas e nanobiotecnológicas para uso em recuperação do tecido ósseo em estado patológico (osteoporose) e para aplicação em reparo de fratura. Nós selecionamos 4 compostos (T10, T35, T45 e T46) derivados de dipeptídeos e amino-oxidiazois baseados em inibidores da catepsina K com ação inibitória em osteoclastos e boa ativação osteoblástica. Também selecionamos outros 4 compostos (W17, W31, W36 e W53) derivados de 1,2,3-bistriazólicos com diferentes espaçadores e substituintes contendo grupos ácidos carboxílicos com ação antiosteoclastogênica e boa ativação osteoblástica. Ambos demonstraram-se como moléculas promissoras para o tratamento da osteoporose. Além disso, os resultados mostram as ligas Ti35Nb como promissoras ligas para implantes ortodônticos e ortopédicos visto que permitem o crescimento celular de osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas. Este trabalho também avalia a eficiência de nanomateriais em scaffolds de colágeno e matriz de fígado descelularizados (LEM) para culturas primárias de hepatócitos. Os resultados demonstraram que os scaffolds de LEM são benéficos para a sobrevivência de hepatócitos em cultura e o sucesso na produção dos scaffolds funcionalizados com os nanomateriais abre possibilidades no estudo da entrega controlada de genes e drogas in vitro e in vivo.

Palavras-chave: Tecido ósseo, osteoporose, compostos anti-osteoporóticos, ligas de titânio, scaffolds

Abstract

In Brazil, osteoporosis affects about 10 million people. Although there are many drugs already commercialized for osteoporosis treatment, the researchers are still looking for a more efficient drug, with fewer side effects and requiring lower doses than those already administered. In addition, bone regeneration is an aspect of biology under constant investigation and the stage for recent research involving therapeutic products and the development of alternatives for fracture restoration. In this context, nanobiotechnology is gaining prominence and is being directly applied in the development of implants and supports for cell cultures. Research aimed at the repair of fractures seeks to develop bioactive materials capable of establishing a communication between the material and the cellular tissue, helping the formation of blood vessels and accelerating bone repair. Titanium alloys, for example, are currently undergoing changes in their composition and surface in order to improve implants. In addition to the already sold alloys, biological materials have gained prominence in the implant market, such as the use of decellularized organs. These organs serve as cellular supports for future implants. That said, the objective of this work was to study pharmacological and nanobiotechnological therapeutic strategies for use in the recovery of bone tissue in a pathological state (osteoporosis) and application in fracture repair. We selected 4 compounds (T10, T35, T45 and T46) derived from dipeptides and amino-oxy-oxides based on cathepsin K inhibitors that have an inhibitory effect on osteoclasts and good osteoblastic activation. We also selected 4 other compounds (W17, W31, W36 and W53) derived from 1,2,3-bistriazoles with different spacers and substituents containing carboxylic acid groups with anti-osteoclastogenic action and good osteoblast activation. Together, these compounds have shown to be promising molecules for the osteoporosis treatment. In addition, the results show Ti35Nb alloys as promising for orthodontic and orthopedic implants, as they allow the cell growth of osteoblasts and human mesenchymal stem cells. The data evaluate the efficiency of nanomaterials in collagen and liver extracellular matrix (LEM) scaffolds for primary cultures of hepatocytes and implants. The results demonstrated that LEM scaffolds are beneficial for the survival of hepatocytes in culture and the success in producing scaffolds functionalized with nanomaterials opens up possibilities in the study of the controlled genes and drugs delivery in vitro and in vivo.

Keywords: bone tissue, osteoporosis, anti-osteoporotic compounds, titanium alloys, scaffolds.

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

Figura 1. Microambiente ósseo e células que compõem o tecido ósseo.....	23
Figura 2. Osteoclastogênese via sinalização RANKL/RANK/OPG.....	28
Figura 3. Modelamento ósseo.....	29
Figura 4. Ciclo de remodelamento ósseo.....	31
Figura 5. Osteoclastogênese.....	33
Figura 6. Processo de reabsorção óssea no osteoclasto.....	34
Figura 7. Osteoporose e fatores de risco.....	37

Capítulo 1

Figura 1. Representação esquemática da interação dos inibidores com os sítios ativos da catepsina K.....	46
Figura 2. Estruturas gerais dos compostos testados neste trabalho.....	48
Fluxograma 1. Resumo dos grupos experimentais utilizados neste trabalho.....	51
Fluxograma 2. Resumo dos experimentos realizados neste capítulo com osteoblastos de ratos e hASC.....	52
Figura 3. Processo de extração dos precursores de osteoclastos.....	55
Fluxograma 3. Resumo dos experimentos com células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6 utilizados neste capítulo.....	56
Figura 4. Viabilidade dos rOB.....	62
Figura 5. Atividade da ALP em rOB.....	63
Figura 6. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em rOB expostos aos compostos sintetizados durante 14 dias de maturação.....	64
Figura 7. Fotomicrografia da coloração por <i>Alizarin Red S</i> em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	65
Figura 8. Fotomicrografia da coloração <i>Von kossa</i> em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	66
Figura 9. Quantificação de colágeno produzidos pelos rOB.....	67
Figura 10. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	68
Figura 11. Viabilidade das hASC.....	71
Figura 12. Atividade da ALP em hASC.....	72
Figura 13. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em hASC expostos aos compostos sintetizados após 21 dias de diferenciação celular.....	73
Figura 14. Fotomicrografia da coloração por <i>Alizarin Red S</i> em hASC expostos aos compostos sintetizados após 21 dias de diferenciação celular.....	74
Figura 15. Fotomicrografia da coloração <i>Von kossa</i> em hASC expostos aos compostos sintetizados após 21 dias de cultivo.....	75
Figura 16. Quantificação de colágeno produzidos pelos hASC.....	77
Figura 17. Fotomicrografia da deposição de colágeno em hASC expostos aos compostos sintetizados após 21 dias de cultivo.....	78
Figura 18. Viabilidade dos compostos em mOB.....	81
Figura 19. Atividade da ALP em mOB.....	82

Figura 20. Fotomicrografia da coloração por <i>Alizarin Red</i> em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	83
Figura 21. Fotomicrografia da coloração por <i>Von Kossa</i> em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	84
Figura 22. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	85
Figura 23. Produção de colágeno em mOB.....	86
Figura 24. Cultura de osteoclastos.....	89
Figura 25. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	90
Figura 26. Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) em osteoclastos expostos aos compostos.....	91
Figura 27. Coloração por TRAP dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	92
Figura 28. Osteoclastos.....	93
Figura 29. Viabilidade dos osteoclastos em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos.....	94
Figura 30. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	95
Figura 31. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	96
Figura 32. Coloração da atividade da fosfatase ácida (TRAP) em osteoclastos cultivados em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos.....	97
Figura 33. Coloração por <i>Von Kossa</i> dos mOB em co-cultura com osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	98

Capítulo 2

Figura 1. Esqueletos moleculares dos 1,2,3-bistriazólicos-1,4-dissubstituídos contendo diferentes espaçadores.....	109
Fluxograma 1. Síntese dos grupos experimentais com osteoblastos utilizados neste capítulo.....	112
Fluxograma 2. Síntese dos experimentos realizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos.....	113
Fluxograma 3. Síntese dos experimentos realizados neste capítulo em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6.....	114
Figura 2. Efeito dos compostos nos osteoblastos de ratos Wistar.....	120
Figura 3. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo....	121
Figura 4. Fotomicrografia da coloração por <i>Alizarin Red</i> em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	122
Figura 5. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	123
Figura 6. Viabilidade dos compostos em mOB.....	125
Figura 7. Atividade da fosfatase alcalina em mOB.....	126
Figura 8. Fotomicrografia da coloração por <i>Alizarin Red S</i> em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	127
Figura 9. Fotomicrografia da coloração por <i>Von kossa</i> em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	128

Figura 10. Fotomicrografia da deposição de colágeno em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo.....	129
Figura 11. Produção de colágeno pelos mOB.....	131
Figura 12. Cultura de osteoclastos.....	133
Figura 13. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	134
Figura 14. Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente em osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	135
Figura 15. Coloração por TRAP dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	136
Figura 16. Viabilidade dos osteoclastos em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos.....	137
Figura 17. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	138
Figura 18. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	139
Figura 19. Coloração por <i>Alizarin Red S</i> dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.....	140

Capítulo 3

Figura 1. Microestrutura das ligas com uma amplificação de 200x.....	155
Figura 2. Microestruturas das ligas após o TQT com uma amplificação de 1.000x.....	156
Figura 3. Microestruturas das ligas após revestimento de 21 dias com uma amplificação de 1.000x.....	157
Fluxograma 1. Resumo dos ensaios realizados neste capítulo da tese.....	158
Figura 4. Ensaio de molhabilidade.....	159
Figura 5. Avaliação da viabilidade dos osteoblastos nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea.....	160
Figura 6. Síntese de fosfatase alcalina pelos osteoblastos cultivados nas ligas de titânio durante a maturação óssea.....	161
Figura 7. Produção de colágeno pelos osteoblastos cultivados nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea.....	162
Figura 8. Imagens de MEV das ligas Ti35Nb cultivadas com rOB.....	163
Figura 9. Avaliação da viabilidade das hASC nas ligas de titânio-nióbio durante a diferenciação celular.....	164
Figura 10. Síntese de fosfatase alcalina pelas hASC cultivadas nas ligas de titânio durante a diferenciação celular.....	165
Figura 11. Produção de colágeno pelas hASC cultivadas nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea.....	166
Figura 12. Imagens de MEV das ligas Ti35Nb cultivadas com hASC.....	168

Capítulo 4

Figura 1. Arquitetura do fígado.....	176
Figura 2. Nanomateriais alótropos do carbono.....	181
Fluxograma 1. Resumo dos ensaios realizados neste capítulo da tese.....	185
Figura 3. Caracterização dos nanomateriais.....	191
Figura 4. Caracterização dos nanomateriais.....	192
Figura 5. Caracterização dos nanomateriais.....	193

Figura 6. Caracterização da descelularização.....	195
Figura 7. Caracterização do colágeno.....	196
Figura 8. Padronização da concentração de nanomateriais.....	198
Figura 9. Caracterização dos <i>scaffolds</i> funcionalizados com os nanomateriais....	199
Figura 10. Caracterização dos <i>scaffolds</i> funcionalizados com os nanomateriais..	200
Figura 11. Imagens de MEV de nanofibras de colágeno funcionalizadas com nGO e MWNTC em <i>scaffolds</i> de colágeno.....	202
Figura 12. Microscopia de força atômica (AFM) dos <i>scaffolds</i> puros e funcionalizados com nanomaterias.....	204
Figura 13. Análise da viabilidade celular de hASC e HepG2.....	205
Figura 14. Cultura de linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	206
Figura 15. Atividade da linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	207
Figura 16. Cultura primária de hepatócitos.....	208
Figura 17. Taxa de absorção de Colágeno e LEM <i>in vivo</i>	209
Figura 18. Viabilidade de rOB cultivados nos <i>scaffolds</i> com meio DMEM.....	210
Figura 19. Atividade da fosfatase alcalina em rOB cultivados nos <i>scaffolds</i> com meio DMEM.....	211
Figura 20. Síntese de colágeno em rOB cultivados nos <i>scaffolds</i> com meio DMEM.....	212
Figura 21. Imagens da atividade da fosfatase alcalina após 7 dias de cultivo com meio DMEM.....	213
Figura 22. Imagens da atividade da fosfatase alcalina após 14 dias de cultivo com meio DMEM.....	213
Figura 23. Imagens da coloração com <i>Alizarin Red S</i> após 7 dias de cultivo com meio DMEM.....	214
Figura 24. Imagens da coloração com <i>Alizarin Red S</i> 14 dias de cultivo com meio DMEM.....	215
Figura 25. Imagens da coloração <i>Von Kossa</i> em rOB cultivados nos <i>scaffolds</i> com meio DMEM.....	216

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Legenda do <i>score</i> da intensidade das colorações utilizadas para comparação entre as diferentes amostras utilizadas.....	58
Tabela 2. Viabilidades das rOB após 48 horas de exposição as amostras.....	59
Tabela 3. Viabilidades das hASC após 48 horas de exposição as amostras.....	60
Tabela 4. Viabilidades das mOB após 48 horas de exposição as amostras.....	61
Tabela 5. Concentração de uso de cada molécula selecionada.....	61
Tabela 6. <i>Score</i> das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de rOBs.....	69
Tabela 7. <i>Score</i> das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de hASC.....	79
Tabela 8. <i>Score</i> das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de mOBs.....	87

Capítulo 2

Tabela 1. Legenda do <i>score</i> da intensidade das colorações utilizadas para comparação entre as diferentes amostras utilizadas.....	116
Tabela 2. Viabilidades das rOB após 48 horas de exposição as amostras.....	117
Tabela 3. Viabilidades das hASC após 48 horas de exposição as amostras.....	118
Tabela 4. Viabilidades das mOB após 48 horas de exposição as amostras.....	119
Tabela 5. Concentração de uso de cada molécula selecionada.....	119
Tabela 6. <i>Score</i> das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de rOBs.....	124
Tabela 7. <i>Score</i> das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de mOBs.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM – Microscopia de força atômica (do inglês, *Atomic Force Microscopy*)
Akt – Proteína quinase B (do inglês, *Protein kinase B*)
ALP – Fosfatase Alcalina (do inglês, *Alkaline phosphatase*)
ANOVA – Análise de variância
BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil (do inglês, *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*)
BCIP-NBT – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/ nitro blue tetrazolium
BGLAP – *Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein*
BMMSCs – Células-tronco mesenquimais da medula óssea (do inglês, *bone marrow mesenchymal stem cells*)
BMPs – Proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, *Bone morphogenetic proteins*)
BSP – Sialoproteína óssea (do inglês, *Bone sialoprotein*)
CatK – Catepsina K
CCC – Cúbica de corpo centrado
c-fms – Receptor do fator 1 estimulador de colônias (do inglês, *Colony-stimulating factor-1 receptor*)
cm⁻¹ – por centímetro
CollA1 – Colágeno I
DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
Dlx5 – *Distal-less homeobox 5*
DMEM – *Meio Eagle Modificado por Dulbecco* (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
DMO – densidade mineral óssea
DMP1 – Proteína da matriz de dentina 1 (do inglês, *Dentin matrix protein 1*)
DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)
EDC – *N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride*
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK – Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *Extracellular signal-regulated kinases*)
FGFs – Fatores de crescimento de fibroblastos (do inglês, *Fibroblast growth factors*)
FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier*
g – Gravidade
GAGs – Glicosaminoglicanos
GPa – Gigapascal
h – Hora
H&E – Hematoxilina e eosina
HA – Hidroxiapatita
hASC – Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (do inglês, *Human adipose-derived stem cell*)
HBSS – Solução Balanceada de Hank's (do inglês, *Hanks' Balanced Salt Solution*)
HC – Hexagonal compacta
HepG2 – Linhagem celular de hepatocarcinoma humano
HGF – Fator de crescimento do hepatócito (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*)
HSCs – Células-tronco hematopoiéticas (do inglês, *Hematopoietic stem cells*)
ICG – Verde de Indocianina (do inglês, *Indocyanine green*)
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês, *insulin-like growth factor-1*)
IMC – índice de massa corporal

IP – Inibidor de protease
kDa – Kilodaltons
LEM – Matriz extracelular de fígados descellularizados (do inglês, *Liver Extracellular Matrix*)
M – Molar
MAO – Micro-arc oxidação
m-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês, *Macrophage Colony Stimulating Factor*)
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg – Miligrama
min – minutos
mL – Mililitro
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MMP-9 – Metaloproteinase de matriz (do inglês, *Matrix Metalloproteinases*)
MWNTC – Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (do inglês, *multiwalled carbon nanotubes*)
NBT – Nitro azul tetrazólio (do inglês, *Nitro Blue Tetrazolium*)
NF-kB – Fator nuclear KappaB (do inglês, *Factor nuclear kappa B*)
ng – Nanograma
nGO – Nano óxido de Grafeno
nm – Nanômetro
NTC – Nanotubo de Carbono
°C – Graus Celsius
OC – Osteocalcina
OPG – Osteoprotegerina
OPN – Osteopontina
OSCAR – Receptor do tipo imunoglobulina associado aos osteoclastos (do inglês, *Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*)
Osx – Osterix
p/v – Peso por volume
PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *Phosphate buffered saline*)
PFA – Paraformaldeído
pH – Potencial hidrogeniônico
PP – Zona periportal
PV – Zona perivenosa
RAKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta (do inglês, *Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*)
RANK – Receptor ativador do fator nuclear Kappa-Beta (do inglês, *Receptor activator of nuclear factor-kappa B*)
Runx2 – Fator de transcrição 2 relacionado com Runt (do inglês, *Runt-related transcription factor 2*)
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SEM – Erro padrão da média
SS – Solução Simplificada
SWNTC – Nanotubos de carbono de parede única (do inglês, *single-walled carbon nanotubes*)
TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta (do inglês, *Transforming growth factor beta*)
TQT – Tratamento químico e térmico
TRAcP – Fosfatase ácida resistente ao tártaro (do inglês, *Tartrate-resistant acid phosphatase*)

TRAF-6 – Fator associado ao receptor de TNF 6 (do inglês, *TNF Receptor Associated Factor 6*)

UV – Ultravioleta

v/v – Volume por volume

β -FGF – fator básico de crescimento de fibroblastos (do inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*)

β -TCP – β -fosfato tricálcico (do inglês, *Tricalcium phosphate*)

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

LISTA DE SIGLAS

C.A.A.E. – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CENANO – Centro de Caracterização em Nanotecnologia para Materiais e Catálise
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CMA – Ligas de titânio com 35% de nióbio macroporosas sem revestimento
CMI – Ligas de titânio com 35% de nióbio microporosas sem revestimento
DCMA – Ligas de titânio com 35% de nióbio macroporosas sem revestimento cultivadas com meio osteogênico
DCMI – Ligas de titânio com 35% de nióbio microporosas sem revestimento cultivadas com meio osteogênico
DMA – Ligas de titânio com 35% de nióbio macroporosas com revestimento de fosfato de cálcio cultivadas com meio osteogênico
DMI – Ligas de titânio com 35% de nióbio microporosas com revestimento de fosfato de cálcio cultivadas com meio osteogênico
EUA – Estados Unidos da América
IARC – Agência Internacional de pesquisa com câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)
INT – Instituto Nacional de Tecnologia
IOF – Fundação Internacional de osteoporose (do inglês, *International Osteoporosis Foundation*)
MA – Ligas de titânio com 35% de nióbio macroporosas revestidas com fosfato de cálcio
MI – Ligas de titânio com 35% de nióbio microporosas revestidas com fosfato de cálcio
OMS – Organização Mundial da Saúde
Ti35Nb – Ligas de titânio com 35% de nióbio
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UFSJ – Universidade Federal de São João del-Rei

LISTA DE SÍMBOLOS

Al – Alumínio
BA – Bicarbonato de amônio
C = O – Carbonila
Ca⁺² – Cálcio
CaP – Fosfato de cálcio (do inglês, *Calcium phosphate*)
CaTiO₃ – Titanato de cálcio
CaTiSiO₅ – Titanita
CH₄N₂O – Amônia
CO₂ – Gás carbônico
COOH – Carboxila
FeTiO₃ – Titanato de ferro
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HCl – Ácido clorídrico
HF – Ácido fluorídrico
MgTiO₃ – Titanato de magnésio
Mo – Molibdênio
N – Nitrogênio
NaCl – Cloreto de sódio
Nb – Nióbio
NH₄HCO₃ – Bicarbonato de amônio
O – Oxigênio
OH – Hidroxila
OsO₄ – Tetróxido de ósmio
PO₄⁻³ – Fosfato
Sn – Estanho
Ta – Tântalo
Ti – Titânio
Ti-Nb – Titânio-nióbio
TiO₂ – Dióxido de titânio
V – Vanádio
Zr – Zircônio
 α – alfa
 β – beta

SUMÁRIO

1. Revisão bibliográfica.....	22
2. Tecido Ósseo.....	23
2.1. Células ósseas.....	24
2.1.1. Osteoblastos.....	24
Matriz óssea.....	25
2.1.2. Osteócitos.....	25
2.1.3. Osteoclastos.....	26
3. Desenvolvimento e modelamento do tecido ósseo.....	28
4. Remodelamento ósseo.....	29
5. Osteoclastogênese.....	31
6. Reabsorção óssea.....	33
7. Osteoporose.....	34
8. Riscos de Fratura.....	36
9. Fármacos na recuperação óssea e osteoporose.....	38
10. Alternativas na terapia de reparo ósseo.....	39
11. Objetivo Geral.....	40
12. Referências bibliográficas.....	40
CAPÍTULO 1: Avaliação dos efeitos de novas moléculas inibidoras da catepsina K para tratamento da osteoporose.....	44
1. Introdução.....	44
1.1. Catepsina K.....	44
1.2. Inibidores da Catepsina K.....	45
2. Objetivos.....	47
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos específicos.....	47
3. Material e Métodos.....	47
3.1. Novas moléculas inibidoras da catepsina K.....	47
3.2. Comitê de ética.....	48
3.3. Extração de osteoblastos.....	48
3.4. Extração de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC).....	49
3.5. Grupos experimentais.....	50
3.6. Teste de citocompatibilidade em osteoblastos e hASC.....	51
3.6.1. Viabilidade celular.....	52

3.6.2. Atividade da fosfatase alcalina.....	53
3.6.3. Produção de colágeno.....	53
3.6.4. Coloração por <i>Alizarin Red S</i>	54
3.6.5. Coloração por <i>Von Kossa</i>	54
3.6.6. Coloração por <i>Sírius Red</i>	54
3.7. Isolamento dos precursores de osteoclastos.....	55
3.8. Diferenciação osteoclástica.....	56
3.9. Coloração por TRAP.....	57
3.10. Ensaio de co-cultura.....	57
3.11. Análise qualitativa das fotomicrografias.....	57
3.12. Análise estatística.....	58
4. Resultados.....	58
4.1. Seleção dos compostos.....	58
4.2. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos de ratos Wistar (rOB).....	62
4.3. Potencial osteogênico das moléculas nas células-tronco mesenquimais humanas (hASC).....	69
4.4. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB).....	80
4.5. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas nos precursores de osteoclastos de camundongos C57bl/6.....	87
4.6. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas em cocultura de osteoclastos e osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB).....	93
5. Discussão.....	98
6. Conclusão.....	103
7. Perspectivas	103
8. Referências bibliográficas.....	104
CAPÍTULO 2: Avaliação dos efeitos de derivados bis-1,2,3-trizólicos na osteogênese e osteoclastogênese.....	107
1. Introdução.....	107
1.1 Derivados bis-1,2,3-trizólicos.....	107
2. Objetivos.....	108
2.1. Objetivo Geral.....	108
2.2. Objetivos específicos.....	108
3. Material e Métodos.....	109
3.1. Derivados bis-1,2,3-trizólicos	109
3.2. Comitê de ética.....	109

3.3. Extração de osteoblastos.....	110
3.4. Extração de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo.....	110
3.5. Grupos Experimentais.....	111
3.6. Teste de citocompatibilidade em osteoblastos e hASC.....	112
3.7. Isolamento de precursores de osteoclastos.....	113
3.8. Diferenciação osteoclástica.....	115
3.9. Coloração por TRAP.....	115
3.10. Ensaio de co-cultura.....	115
3.11. Análise qualitativa das fotomicrografias.....	115
3.12. Análises estatísticas.....	116
4. Resultados.....	116
4.1. Seleção dos compostos.....	116
4.2. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos (rOB).....	120
4.3. Potencial osteogênico das moléculas nos camundongos C57/bl6 (mOB).....	124
4.4. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas nos precursores de osteoclastos de camundongos C57bl/6.....	131
4.5. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas em cocultura de osteoclastos e osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB).....	137
5. Discussão.....	141
6. Conclusão.....	143
7. Perspectiva	143
8. Referências bibliográficas.....	144
CAPÍTULO 3: Avaliação da biocompatibilidade de ligas de Titânio-Nióbio revestidas com fosfato de cálcio em osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas.....	146
1. Revisão bibliográfica.....	146
1.1. Biomateriais.....	146
1.1.1. Classificação dos biomateriais.....	146
1.1.2. Propriedades mecânicas e físico-químicas.....	148
1.1.3. Biocompatibilidade.....	149
1.2. Titânio.....	149
1.2.1. Ligas de Titânio.....	150
1.2.2. Porosidade.....	151
1.2.3. Titânio-Nióbio.....	152
1.2.4. Fosfato de cálcio como revestimento de biomateriais.....	153
2. Objetivos.....	154
2.1. Objetivo Geral.....	154

2.2. Objetivos específicos.....	154
3. Material e Métodos.....	154
3.1. Ligas de Titânio-Nióbio revestidas com fosfato de cálcio.....	154
3.2. Teste de molhabilidade.....	158
3.3. Testes de citocompatibilidade.....	158
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	158
3.5. Análises estatísticas.....	158
4. Resultados.....	159
4.1. Teste de molhabilidade.....	159
4.2. Teste de citocompatibilidade em rOB.....	160
4.2.1. Ensaio de viabilidade celular.....	160
4.2.2. Atividade da Fosfatase Alcalina.....	161
4.2.3. Produção de colágeno.....	161
4.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	162
4.3. Testes de citocompatibilidade em hASC.....	164
4.3.1. Ensaio de viabilidade celular.....	164
4.3.2. Atividade da Fosfatase Alcalina.....	164
4.3.3. Produção de colágeno.....	166
4.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	167
5. Discussão.....	168
6. Conclusão.....	172
7. Perspectiva	172
8. Referências bibliográficas.....	172
CAPÍTULO 4: Uso de suportes derivados da matriz descelularizada de fígados na manutenção do cell fate de hepatócitos e osteoblastos.....	175
1. Introdução	175
1.1. Hepatócitos.....	175
1.2. Colágeno.....	177
1.3. Matriz Extracelular.....	178
1.4. Nanomateriais.....	180
1.4.1. nGO.....	180
1.4.2. NTC.....	182
2. Objetivos.....	184
2.1. Objetivo Geral.....	184
2.2. Objetivos específicos.....	184
3. Material e Métodos.....	184

3.1. Preparação da LEM.....	186
3.2. Avaliação da descelularização.....	186
3.3. Preparação dos scaffolds.....	187
3.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	188
3.5. Dispersão de luz dinâmica (DLS) e Potencial Zeta.....	188
3.6. Espectroscopia Raman.....	188
3.7. Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	188
3.8. Microscopia de força atômica.....	188
3.9. Cultura primária de hepatócitos.....	189
3.10. Testes de citocompatibilidade.....	189
3.10.1. Indocianina Green (ICG).....	189
3.10.2. Síntese de Ureia.....	189
3.10.3. Secreção de Albumina.....	190
3.10.4. Análises microscópicas.....	190
3.11. Análises estatísticas.....	190
4. Resultados.....	191
4.1. Caracterização dos Nanomateriais à base de carbono.....	191
4.2. Avaliação da descelularização.....	194
4.3. Preparação e caracterização dos scaffolds.....	196
4.4. Cultura de linhagens de hepatocarcinoma humano (HepG2).....	205
4.5. Cultura primária de hepatócitos.....	207
4.6. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar cultivados com meio basal.....	209
5. Discussão.....	216
6. Conclusão.....	223
7. Perspectiva	224
8. Referências bibliográficas.....	224

1. Revisão Bibliográfica

O osso é um tecido altamente especializado onde um conjunto de processos intrincados e bem coordenados atua para o seu desenvolvimento, manutenção e regeneração. A regeneração óssea é um aspecto da biologia em constante investigação e palco para recentes pesquisas envolvendo produtos terapêuticos e desenvolvimento de alternativas para o reestabelecimento de fraturas. Neste contexto, a nanobiotecnologia ganha destaque e está sendo diretamente aplicada no desenvolvimento de implantes e suportes para culturas celulares.

No Brasil, a osteoporose acomete cerca de 10 milhões de pessoas com um custo de 1,2 bilhões de reais anuais aos cofres públicos (1). Custos que envolvem perda da produtividade e despesas com hospitalização. Em países da América latina, como o Brasil, Argentina e México, pacientes com fratura de quadril chegam a esperar pela cirurgia até 7 dias, contrariando a recomendação da OMS (Organização Mundial de Saúde) que pede a intervenção em no máximo dois dias (2). Apesar de haver já medicamentos em clínica, ainda não encontramos um fármaco isento de efeitos colaterais e ideal para uso prolongado e contínuo.

Atualmente, as pesquisas voltadas para o reparo de fraturas sejam elas osteoporóticas ou não procuram desenvolver materiais bioativos capazes de estabelecer uma comunicação entre o material e o tecido celular, auxiliando a formação dos vasos sanguíneos e acelerando a recuperação do osso. As ligas de titânio, por exemplo, são extensivamente utilizadas no mercado ortodôntico e ortopédico. Atualmente, essas ligas vêm sofrendo modificações em sua composição e na sua superfície visando a melhoria dos implantes (3). Esses biomateriais, em contato com os fluidos fisiológicos, além de regenerar a camada perdida são capazes de fazer ligações iônicas com o tecido ósseo e, portanto é foco de pesquisas atuais.

Além das ligas já comercializadas, materiais biológicos têm ganhado destaque no mercado de implantes, como o uso de órgãos descelularizados. Esses órgãos servem de suportes celulares para futuros implantes (4). Outro destaque das pesquisas atuais é a aplicação da nanotecnologia na construção de suportes celulares. Dentre os materiais de escala nanométrica, podemos destacar os nanotubos de carbono (NTC) e o nanoóxido de grafeno (nGO). Esses nanomateriais possuem propriedades eletrônicas, mecânicas e químicas únicas e podem ser associados a proteínas de interesse melhorando suas propriedades e inserindo novas características aos suportes celulares.

2. Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo diferenciado, altamente dinâmico e ativo, composto por uma matriz extracelular orgânica mineralizada e vários tipos celulares (5). Tem funções importantes como suporte e locomoção, proteção dos órgãos internos, participa do armazenamento de minerais como o cálcio e fósforo, além de ser o responsável pela homeostase desses eletrólitos (5). Os quatro principais tipos celulares que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e as células da superfície de repouso (Figura 1). Juntas, essas células estão em constante atividade realizando constantemente processos de reabsorção e formação óssea (5).

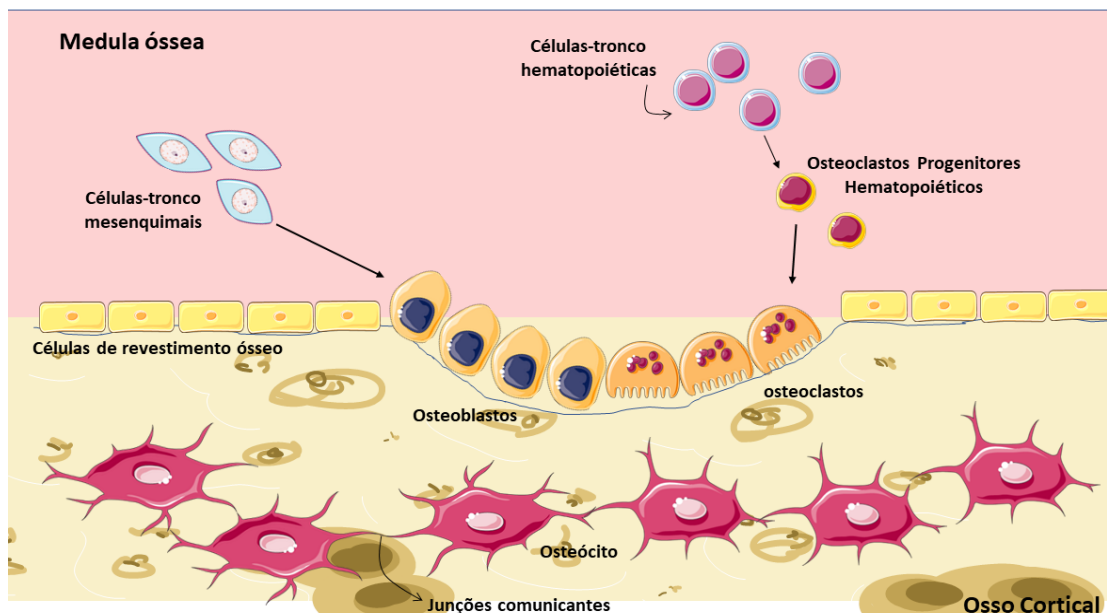


Figura 1. Microambiente ósseo e células que compõem o tecido ósseo. O microambiente ósseo é formado por diversos tipos celulares, como as células de revestimento ósseo, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos, células-tronco mesenquimais e células-tronco hematopoiéticas e vários progenitores. Essas células trabalham coordenadamente para manter a homeostase do tecido ósseo. *Fonte: próprio autor.*

Desta forma, as células ósseas estão em constante atividade, trabalhando sincronizadas em um processo denominado de remodelação óssea, rotineiro e necessário para o organismo. É por meio deste processo que o organismo é capaz de consolidar uma fratura, adaptar o esqueleto ao uso mecânico e a manter a homeostase do cálcio (6). Um desbalanço entre a atividade dos osteoclastos e dos osteoblastos atinge diretamente a remodelação óssea, podendo levar o organismo a complicados quadros clínicos, como a osteoporose e a osteopetrose (6, 7).

Apesar do balanço entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos ser extremamente importante para o remodelamento ósseo, este não é o único fator responsável no equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. O processo de remodelamento ósseo depende da ação de vários fatores locais e sistêmicos, como hormônios, citocinas, quimiocinas e estimulação biomecânica (7).

2. 1. Células ósseas

2. 1. 1. Osteoblastos

Os osteoblastos são advindos da diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMMSCs). Inicialmente, as BMMSCs se diferenciam em direção a uma linhagem osteo / condroprogenitora elevando a expressão de genes específicos como fator de transcrição 2 relacionado com Runt (Runx2) e seus genes a jusante Osterix (Osx) e Distal-less homeobox 5 (Dlx5). O gene Runx2 conduz a expressão dos principais genes específicos de osteoblastos, como Fosfatase Alcalina (ALP) e colágeno I (Col1A1), sialoproteína óssea (BSP) e BGLAP (gene que codifica a osteocalcina (OCN)) sendo essencial na osteogênese (8, 9). Assim que formados, os osteoprogenitores se proliferam para posteriormente se tornarem pré-osteoblastos, passando a expressar grandes quantidades de ALP. Posteriormente, essas células se diferenciam em osteoblastos maduros, e neste estágio, a expressão de ALP diminui progressivamente, os osteoblastos secretam grandes quantidades de proteínas da matriz óssea e, o OCN é considerado um marcador deste passo de diferenciação (8, 9).

Além da clássica via Wnt (que ativa diretamente RUNX2), a osteoblastogênese pode ser conduzida pela via das proteínas morfogenéticas (BMPs), que favorecem o compromisso das MSCs da medula óssea em relação a um osteo / condroprogenitor ou por fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) que aumentam a expressão de Runx2 em MSCs e promovem a atividade de ALP e a mineralização óssea (8).

Os osteoblastos são os responsáveis pela deposição e mineralização da matriz óssea. Essas células são responsáveis pela secreção de colágeno tipo I e proteínas não colágenas, como a osteopontina (OPN), a osteonectina, BSP, sialoproteína de dentina e proteína da matriz de dentina 1 (DMP1) e OCN (10). À medida que os níveis locais de Ca^{+2} e fosfato (PO_4^{-3}) se elevam, eles precipitam, formando os cristais de hidroxiapatita e a matriz orgânica (osteóide) é mineralizada. Durante a mineralização, vesículas extracelulares com membranas enriquecidas com fosfatase alcalina e fosfolípídeos ácidos são secretadas pelos condrócitos e osteoblastos liberando cristais de hidroxiapatita no meio extracelular, os quais são depositados

entre as fibrilas de colágeno tipo I (11-13). Após o período de maior atividade dos osteoblastos, quando estes já não são mais tão necessários, uma parte dos osteoblastos maduros (15%) darão origem aos osteócitos enquanto o restante ou se tornarão inativos dando origem as células de revestimento ou irão entrar em apoptose.

Matriz óssea

A matriz óssea é composta basicamente por três componentes principais: mineral, matriz orgânica e água. Esses três componentes atuam em conjunto no comportamento mecânico do osso apresentando determinada interdependência, por exemplo, a formação de colágeno I em fibrilas afeta a mineralização, que por sua vez pode afetar o estado de hidratação da matriz orgânica (14).

A fase mineral é composta pelo fosfato de cálcio que formam os cristais minerais ósseos denominados hidroxiapatita. Os cristais estão presentes nas regiões gap das fibrilas e em regiões extrafibrilares de colágeno (15). A fase orgânica do osso é composta principalmente por uma rede de colágeno tipo I interligado que confere resistência a fase mineral que é frágil. Além do colágeno, a fase orgânica é composta por proteínas não colágenas (NCPs), incluindo osteocalcina (OC) e osteopontina (OPN) (15). Já a água, um componente abundante do tecido ósseo, é responsável pela rigidez e resistência do osso. A água está presente na rede mineral, está integrada na ultraestrutura do tropocolágeno e está localizada nos poros dentro dos canais Haversianos, canalículos e lacunas. A água ligada à matriz fornece ductilidade à matriz orgânica visto que, a água permite que o colágeno se estenda além do ponto de elasticidade do osso (16).

2. 1. 2. Osteócitos

Os osteócitos são oriundos dos osteoblastos maduros e permanecem embutidos na matriz óssea. Os osteócitos são células com citoplasma arredondado e pequeno com extensas projeções citoplasmáticas as quais formam junções comunicantes com outros osteócitos e com os osteoblastos. É por meio das junções comunicantes que as células trocam sinais e íons enquanto os nutrientes e oxigênio chegam aos osteócitos por meio do espaço paracanalicular (17).

Até se tornar um osteócito maduro, o osteoblasto passa por diferentes estágios, sofre diferentes mudanças morfológicas até adquirir a morfologia final, característica dos osteócitos maduros. À medida que ocorre a deposição da matriz óssea, os osteoblastos ficam embutidos

no osteóide e, neste estágio de diferenciação, as células são chamadas de osteócitos jovens. Estas células possuem um aparelho de Golgi bem desenvolvido para armazenamento de colágeno. Os osteócitos maduros apresentam uma redução no retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi já que há uma diminuição na síntese e secreção de proteínas (17). Os osteócitos mantêm a matriz orgânica sintetizando regularmente proteoglicanos e proteínas como OCN, OPN, proteína 1 da matriz de dentina (Dentin matrix protein 1, DMP1) (18).

Os osteócitos são células mecanossensoras capazes de converter um estímulo mecânico em um sinal biológico. Esse fenômeno é possível devido aos numerosos e extensos prolongamentos citoplasmáticos dessas células que formam uma rede tridimensional envolvida por um complexo de proteínas que também são associadas aos cílios, ao citoesqueleto e a actina (19, 20). Dentro das lacunas, os osteócitos estão imersos em fluido. Um estímulo advindo de uma carga mecânica externa promove o fluxo deste fluido nos canais lacunares. A oscilação deste fluxo promove uma força de arrasto na superfície celular dos osteócitos provocando uma resposta fisiológica específica (21).

Além disso, os osteócitos participam ativamente do remodelamento ósseo. São células sensíveis as mudanças de cálcio sérico, participando ativamente da homeostase deste íon. Quando expostos a níveis extremamente baixos de cálcio, os osteócitos estimulam a reabsorção óssea perilacunar/ canalicular, liberando íons cálcio (Ca^{+2}) no meio extracelular, elevando sua concentração plasmática (18, 22). Quando um osteócito entra em apoptose ele secreta fatores como as citocinas IL-1, IL-6, além de TGF- β , INF, OPG e RANKL, importantes no recrutamento de células ósseas, estimulando a formação de osteoclastos e consequentemente, estimulando a reabsorção óssea (23-25).

2. 1. 3. Osteoclastos

Os osteoclastos são células grandes e polarizadas com uma morfologia bem característica. Sua principal função é a reabsorção da matriz óssea e este fenômeno ocorre na porção da membrana plasmática voltada para a matriz óssea, enquanto que na porção oposta, estão localizados bombas de sódio e potássio e trocador de ânions $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$. Nesta porção, a membrana plasmática forma várias dobras profundas, com estruturas com características de adesão (podossomos), e nas proximidades se forma a “zona de selamento”, local que será reabsorvido na superfície do osso (26).

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas (de 4 a 20 núcleos) que surgem das células-tronco hematopoiéticas (HSCs). A osteoclastogênese é desencadeada pelos fatores

de transcrição PU-1 e o fator de transcrição da microftalmia que comprometem as HSCs em direção a um progenitor de macrófago / osteoclastos. O PU-1 atua como um ativador transcricional do NFATc1 e está envolvido na expressão e transativação de genes específicos de osteoclastos *Ctsk*, *Acp5* e *Itgb3*, em cooperação com NFATc1 (27). Os progenitores de macrófago / osteoclastos expressam em sua superfície *c-fms*, o receptor para a citocina M-CSF (28). O m-CSF é secretado por uma variedade de tipos celulares incluindo fibroblastos, monócitos, macrófagos ativados e células estromais da medula óssea (29, 30). O m-CSF atua na ativação de ERK/Akt, estimulando a proliferação e sobrevivência dos progenitores de macrófagos/osteoclastos, e aumenta a expressão de RANK nos precursores de osteoclastos (28, 31), ativando a sinalização RANKL / RANK / OPG (Figura 2). Detalhadamente, osteócitos, osteoblastos e células do estroma liberam RANKL que irá se ligar ao seu receptor RANK, nas superfícies dos precursores de osteoclastos. O RANK interage com TRAF-6, desencadeando a diferenciação de osteoclastos via fator nuclear KappaB (NF- κ B) (32). Finalmente, a diferenciação dos osteoclastos pode ser verificada com o aumento da expressão de genes específicos como TRAcP, receptor de calcitonina, catepsina K, metaloproteinase de matriz (MMP-9) e OSCAR (33).

Para ocorrer o processo de reabsorção óssea, os podossomos se organizam em estruturas chamadas de anéis de actina, que tem como função primordial selar a lacuna de absorção, permitindo que o processo de degradação da matriz óssea ocorra. Resumidamente, assim que formado os anéis de actina e finalizado o selamento da região a ser absorvida, o osteoclasto libera íons H^+ nas lacunas de reabsorção, iniciando uma fase de acidificação, com o objetivo de dissolver os cristais de hidroxiapatita. A dissolução dos cristais de hidroxiapatita expõe os componentes orgânicos da matriz óssea que, por sua vez, é digerida pela catepsina K e pela MMP-9 (26, 31, 33). A digestão da matriz óssea libera fatores de crescimento armazenados na matriz, como BMPs, IGF-1 e TGF- β , que estimulam os osteoblastos, reiniciando o processo de remodelamento ósseo, em tecidos sadios.

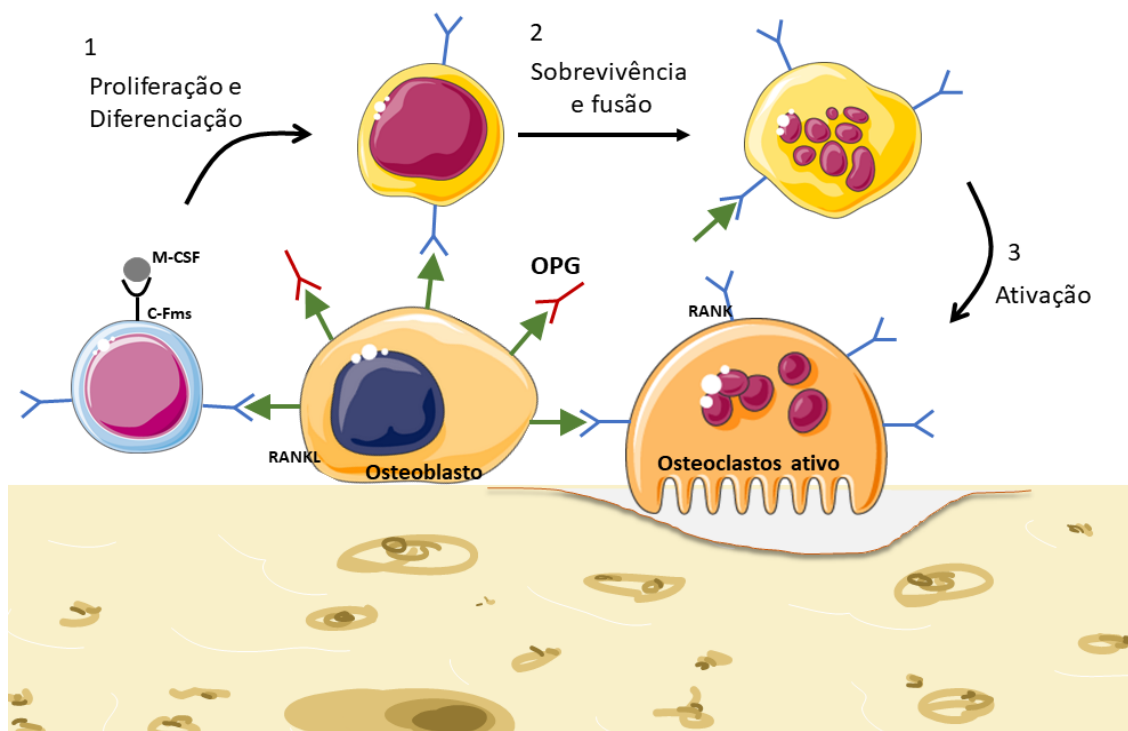


Figura 2. Osteoclastogênese via sinalização RANKL/RANK/OPG. Progenitores de macrófago / osteoclastos são recrutados da circulação e ativados pela citocina m-CSF que se ligará ao receptor c-fms. Essa ligação resultará na proliferação e diferenciação desses progenitores em células mononucleadas precursoras de osteoclastos. Os osteoblastos expressam e secretam o RANKL que conduz a ativação do RANK na superfície dos pré-osteoclastos, mediando assim a diferenciação e função osteoclástica. A OPG, expressa por osteoblastos e osteócitos, liga-se competitivamente ao RANKL, impedindo assim a interação entre RANK/RANKL, inibindo a diferenciação osteoclástica e controlando a reabsorção óssea

3. Desenvolvimento e modelamento do tecido ósseo

O tecido ósseo está em constante atividade em dois processos denominados de modelamento, na qual o osso é construído, e o remodelamento ósseo, na qual o osso é renovado (Figura 3). Em ambos os processos, osteoblastos e osteoclastos estão em constante atividade, realizando a formação e a reabsorção óssea. A diferença entre os dois processos é que, durante o modelamento ósseo, a formação e a reabsorção óssea ocorrem em locais distintos com o objetivo de realizar mudanças importantes na arquitetura óssea. O remodelamento ósseo ocorre de modo a prevenir o excesso de mineralização do tecido e manter a homeostase mineral no organismo. Ademais, o processo de formação e absorção óssea coexistem espacialmente e temporalmente de modo que cerca de 10% do esqueleto é substituído a cada ano (34).

A formação do esqueleto ocorre em dois processos distintos, de acordo com o tipo de osso, planos ou axial e apendicular. Nos ossos planos, as células mesenquimais se diferenciam

em osteoblastos que irão secretar e mineralizar a matriz, e este processo é chamado de ossificação intramembranosa (34). No esqueleto axial e apendicular, um molde de cartilagem é substituído por osso, e este processo é denominado de ossificação endocondral. Neste processo, condrócitos secretam matriz rica em colágeno tipo II, formando a cartilagem. Após intensa proliferação, os condrócitos se diferenciam e secretam uma matriz rica em colágeno tipo X que será mineralizado e servirá de molde para a formação trabecular mediada pelos osteoblastos e osteoclastos durante o modelamento ósseo. No final do processo, parte dos condrócitos entram em apoptose o que resultará na vascularização e formação do centro de ossificação primário dos ossos (34).

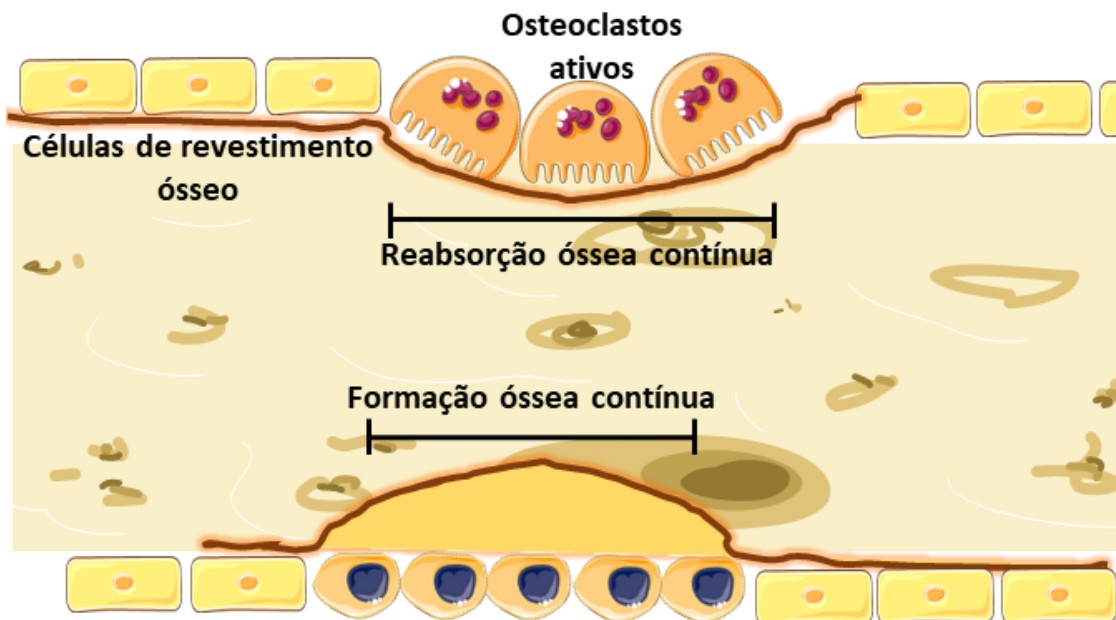


Figura 3. Modelamento ósseo. Formação e a reabsorção óssea ocorrendo em locais distintos com o objetivo de realizar mudanças na arquitetura óssea

4. Remodelamento ósseo

O processo de remodelamento ósseo é fundamental para a autoregulação, manutenção do tecido, homeostase mineral e cicatrização de fraturas. No osso trabecular, a remodelação óssea ocorre nas lacunas de Howship, que são reabsorvidas e posteriormente preenchidas. No osso cortical, os osteoclastos reabsorvem o osso danificado formando um cone de corte onde o osso novo é depositado concentricamente formando uma região de suprimento vascular dentro do canal de Havers (34, 35). O processo de remodelação óssea pode ser dividido em 5 etapas: ativação, reabsorção, reversão, formação e término (Figura 4).

Durante a ativação, os precursores de osteoblastos e osteoclastos recebem um sinal inicial, originado pelos osteócitos ou por hormônios (PTH, por exemplo). Neste momento, os progenitores de macrófago / osteoclastos são recrutados da circulação e ativados pela citocina m-CSF que se ligará ao receptor c-fms. Essa ligação resultará na proliferação e diferenciação desses progenitores em células mononucleadas precursores de osteoclastos. Essas células mononucleadas se fundem para formar os pré-osteoclastos multinucleados que irão formar a zona de selamento. Para tal, as células de revestimento expõem a superfície a ser reabsorvida, permitindo o acesso dos osteoclastos (34, 35). Quando ativos, os osteoclastos repousam sobre a superfície do osso e, por meio da ação de enzimas formam as lacuna de Howship ou lacuna de reabsorção, local onde ocorrerá a reabsorção óssea (28, 34).

Em seguida, inicia-se a fase de reabsorção. Para tal, os osteoclastos, por meio da H^+ -ATPase, bombeiam prótons H^+ para o compartimento de reabsorção, gerando íons HCO_3^- no interior da célula. Para manter a neutralidade do citoplasma, os osteoclastos eliminam Cl^- pelos canais de cloreto. No meio extracelular, o H^+ se liga ao Cl^- formando ácido clorídrico, que irá desmineralizar a matriz óssea, expondo as fibras de colágeno. As fibras de colágeno são então degradadas por proteinases como a catepsina K e MMP-9. Após o período de reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose, encerrando a fase de reabsorção óssea (28, 34). Na fase de reversão, a superfície do osso que acabou de ser reabsorvida agora receberá uma matriz óssea nova. Para isso, células de linhagem osteoblástica removem a matriz de colágeno não mineralizada e então, uma “linha de cimento” é depositada para a adesão de osteoblastos na região a ser formada (34).

É durante a formação que o osteóide será formado. Primeiramente, os osteoblastos sintetizam e secretam as proteínas da matriz (colágeno tipo I principalmente). Em seguida, os osteoblastos irão regular a mineralização dos osteóides. Finalizando o remodelamento ósseo, temos a fase de terminação. Nesta fase, parte dos osteoblastos sofrem apoptose, outra parte se transforma nas células de revestimento e outra parte fica embebido no osteóide e diferenciam-se em osteócitos. Os osteócitos secretam antagonistas de osteogênese inibindo a formação de mais tecido ósseo (34, 35).

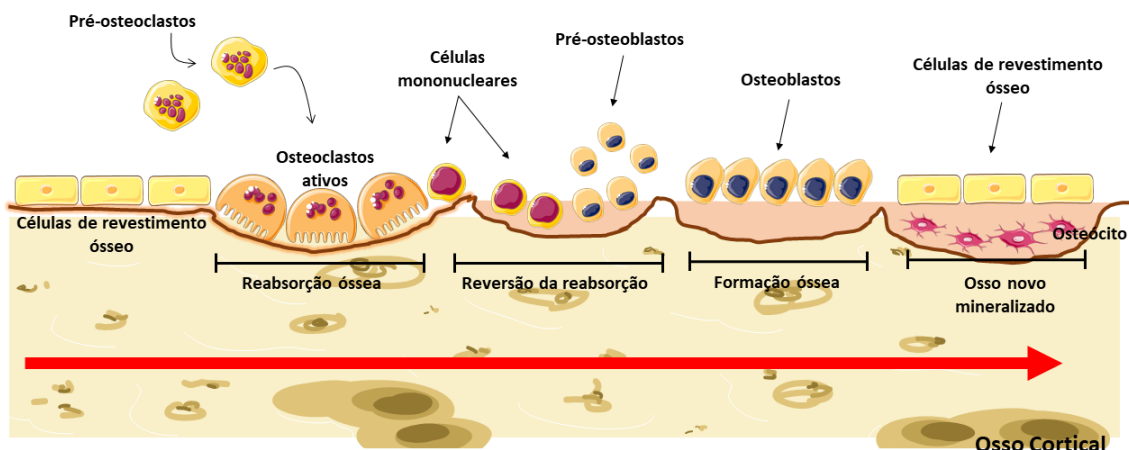


Figura 4. Ciclo de remodelamento ósseo. O remodelamento ósseo ocorre nas lacunas de Howship, que são reabsorvidas pela atividade dos osteoclastos e posteriormente preenchidas pela atividade dos osteoblastos. Os osteoclastos reabsorvem o osso danificado formando um cone de corte onde o osso novo é depositado concentricamente formando uma região de suprimento vascular dentro do canal de Havers.

O processo de cicatrização óssea se divide em dois: a cicatrização primária e secundária. Primeiramente, ocorre o processo de cicatrização primária no qual os osteoblastos depositam os osteóides na superfície do osso desprotegido, por meio do sistema haversiano, numa tentativa de reestabelecer as conexões entre os fragmentos ósseos. Em seguida, inicia-se a cicatrização secundária. Na região da fratura inicia-se a formação de um hematoma, reconhecida pela inflamação e hipóxia local, importantes no recrutamento de células imunológicas e fatores de crescimento que desencadearão o processo de cicatrização. Posteriormente, MSCs migram e proliferam e serão responsáveis pela regeneração da vasculatura local que, por sua vez, permite o influxo de precursores de osteoblastos e condrócitos. Os condrócitos formarão um molde de cartilagem entre os fragmentos ósseos, unindo-os em definitivo. Após a formação da matriz cartilaginosa, os condrócitos entram em apoptose e então, os osteoblastos iniciam a deposição de osteóide. À longo tempo, esse novo osso sofre remodelamento ósseo e posteriormente se tornará indistinguível do osso nativo (36-39).

5. Osteoclastogênese

Os osteoclastos são células multinucleadas altamente especializadas responsáveis pela reabsorção óssea. Juntamente com os osteoblastos, os osteoclastos são responsáveis pelo remodelamento ósseo e pela manutenção da microestrutura óssea (40). Os osteoclastos são derivados das células-tronco hematopoiética pluripotentes que darão origem ao primeiro precursor hematopoiético capaz de formar osteoclastos: a unidade formadora de colônias de

granulócitos-macrófagos (CFU-GM - *colony-forming unit for granulocytes and macrophages*). O fator m-CSF se liga ao seu receptor c-fms presente na superfície das células progenitoras de macrófagos / osteoclastos estimulando a sobrevivência e proliferação destas células (41, 42) (Figura 5).

A diferenciação e ativação dos osteoclastos são desencadeadas pela interação entre o RANKL e o RANK. O RANKL é um ligante expresso na superfície de osteoblastos e células estromais do osso. Pertence à família do TNF e sua expressão é positivamente regulada em resposta ao PTH, 1,25-dihidroxitamina D3 (1,25(OH)₂D₃), prostaglandina E2 (PGE₂) e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17) (40). O RANK é uma proteína de membrana expressa por células mononucleadas precursoras de osteoclastos (40, 41).

A osteoclastogênese é iniciada pela ligação RANKL-RANK. A ligação RANKL-RANK provoca uma modificação conformacional no RANK, que recruta moléculas adaptadoras como o receptor do fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (TRAF6). O complexo RANK/TRAF6 ativa uma cascata de sinalização, incluindo proteínas como NF- κ B, proteína ativadora-1 (AP-1), e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (43). A ativação dessa cascata leva a expressão de genes de transcrição osteoclasticos, como o fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1) e c-Fos (43). A ativação da transcrição desses fatores leva a transcrição de genes específicos de osteoclastos, incluindo a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), catepsina K (CatK) e metaloproteinases de matriz (MMPs) (40, 41). Os osteoblastos, por sua vez, também participam da via de sinalização do RANK/RANKL/OPG. Os osteoblastos são responsáveis pela produção e secreção de uma molécula competidora do RANKL, e osteoprotegerina (OPG). A OPG atua como um modulador negativo da reabsorção óssea, pois inibe a via RANKL-RANK ao se ligar ao RANKL, bloqueando a osteoclastogênese induzida pela via RANKL-RANK e conseqüentemente, inibindo a reabsorção óssea (40, 41).

Uma etapa crucial para a diferenciação dos osteoclastos é a multinucleação dos precursores de osteoclastos. Células mononucleares precursoras RANK⁺ recebem o sinal do RANKL ao entrar em contato com células que expressam RANKL iniciando uma cascata de sinalização que culmina com a expressão de genes e sinais quimiotáticos para os monócitos, promovendo a sua fusão com outro monócito. Essa fusão promove o aumento no tamanho dos osteoclastos e transfere o sinal do RANKL para os núcleos adicionais da célula multinucleada recém-formada (Figura 5). A ativação dos osteoclastos é finalizada com a adesão destes ao

osso. No processo de adesão, os osteoclastos reconhecem a matriz a ser reabsorvida e dá se início a reorganização do citoesqueleto que culmina na polarização dos osteoclastos e no início do processo de reabsorção óssea (41, 44).

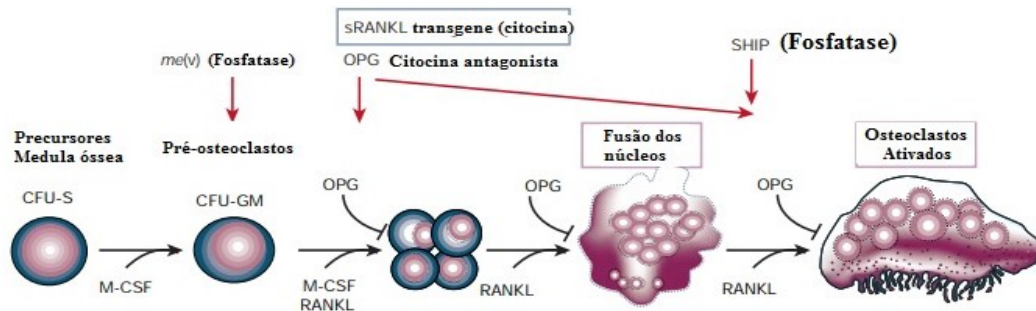


Figura 5. Osteoclastogênese. Os osteoclastos são derivados de uma linhagem de células mononucleares do sangue periférico. O fator m-CSF estimula a proliferação dessas células e a formação dos precursores de osteoclastos. O m-CSF e RANKL são essenciais para a fusão destas células e a formação de células polinucleares. A sinalização do RANKL é a responsável pela maturação e ativação dos osteoclastos. O OPG é um regulador negativo da osteoclastogênese e pode se ligar e neutralizar RANKL. CFU-S: unidades formadoras de colônia; CFU-GM: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; SHIP: inositol 5-fosfatase contendo SH2; OPG: osteoprotegerina; sRANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B solúvel; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; me(v): *motheaten viable*. Figura modificada de Boyle *et al.* (45).

6. Reabsorção óssea

Ao encontrar a área a ser reabsorvida, os osteoclastos se polarizam, por meio da reorganização do citoesqueleto via GTPases da família Rho, formando um domínio apical (secretor) e um domínio basolateral com uma borda ondulada voltada para a interface célula-osso. Nesta região se forma um anel de actina, que isola o microambiente reabsorvido do espaço extracelular geral, constituindo o que chamamos de zona de selamento. A zona de selamento é formada por proteínas contráteis associadas à integrinas como $\alpha\nu\beta3$, que circundam a borda ondulada. A região da matriz mineralizada a ser reabsorvida é reconhecida pela presença de regiões ricas em sequências RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) e este processo é mediado pelas integrinas (41, 44, 45).

O processo de selamento dos osteoclastos provoca uma reorganização do citoesqueleto, transmitindo sinais extracelulares que resultam na migração de vesículas contendo bombas de prótons em direção à membrana da borda ondulada. Os osteoclastos transportam prótons H^+ com o auxílio da $H^+ATPase$, acidificando a lacuna de reabsorção (Figura 6). O H^+ liberado na lacuna de reabsorção é advindo da reação entre o CO_2 e H_2O mediada pela anidrase carbônica, que também forma como subproduto o HCO_3^- . Para evitar a

hiperpolarização e a alcalinização do meio intracelular, a secreção de prótons é contrabalanceada pelo fluxo de Cl^- para o meio exterior por meio dos canais de cloreto e o HCO_3^- é eliminado por meio do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ na membrana basolateral (41, 44, 45).

Na zona de selamento, o Cl^- e H^+ eliminados geram HCl criando um ambiente com pH de 4,5. O pH ácido neste local acarreta na degradação dos componentes minerais do osso, expondo a matriz orgânica do osso (colágeno tipo I). Os osteoclastos secretam várias MMPs, dentre elas, a CatK. Uma vez que a matriz orgânica se encontra exposta, as MMPs degradam e digerem a matriz orgânica do osso. A degradação da matriz orgânica ocasiona a liberação de íons cálcio no meio extracelular, que são utilizados em diversos processos biológicos. Em contrapartida, os elevados níveis de Ca^{+2} na zona de selamento sinalizam a retirada dos osteoclastos da superfície óssea, encerrando a atividade de reabsorção óssea (41, 44, 45).

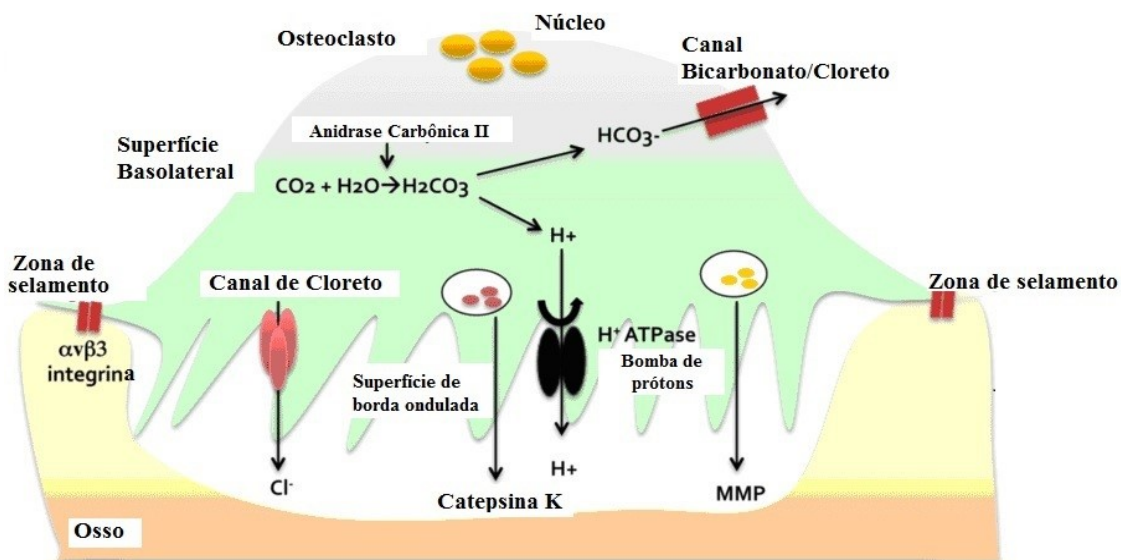


Figura 6. Processo de reabsorção óssea no osteoclastos. Os osteoclastos liberam prótons H^+ na zona de selamento via H^+ ATPase. O Cl^- é eliminado das células pelos canais de cloreto, evitando assim a alcalinização do meio intracelular. O meio extracelular acidificado promove a degradação da matriz inorgânica, expondo a matriz orgânica à ação de metaloproteinases e a catepsina K, liberadas pelos lisossomos. MMP: metaloproteinase de matriz. Figura modificada de Dole *et al.* (46).

7. Osteoporose

A osteoporose é uma das doenças mais importantes na prática geriátrica que acomete homens e mulheres de idade senil. É a causa de aproximadamente nove milhões de fraturas anuais em todo o mundo (47). Segundo a International Osteoporosis Foundation (IOF), a osteoporose acomete cerca de 200 milhões de mulheres em todo o mundo. Uma perda de

apenas 10% da massa óssea é o suficiente para dobrar o risco de fraturas vertebrais e de quadril. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, 10 milhões de brasileiros são afetados pela osteoporose. O padrão-ouro para determinar se um indivíduo tem osteoporose ou não é a medição da densidade mineral óssea do quadril ou coluna vertebral, a partir da absorciometria de raios X de dupla energia (48).

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada pela perda da massa óssea e deterioração da microarquitetura do osso. É uma doença lenta, progressiva e silenciosa e, por ser silenciosa, o indivíduo perde gradualmente mineral ósseo até que seja realizado o diagnóstico. A principal consequência da osteoporose é a fragilidade óssea que eleva o risco de fraturas que, quando acontecem, se torna o primeiro passo para o diagnóstico correto. Nesta enfermidade, o osso cortical afina e a malha do osso trabecular se torna cada vez mais afastada, provocando irregulares que comprometem a estrutura interna do osso. Desta forma, pequenas quedas causam traumatismos e até mesmo o próprio peso do paciente pode causar uma fratura. As principais fraturas da osteoporose são na região distal do rádio, colo do fêmur e coluna vertebral (48-50).

A osteoporose pode ser dividida em tipo I e tipo II. A osteoporose tipo I está relacionada à deficiência do hormônio estrogênio e, por isso, acomete uma fração de 6 mulheres para cada 1 homem e, geralmente acarreta em fraturas vertebrais. Mulheres pré-menopáusicas podem chegar a perder cerca de 0,3% da massa óssea total enquanto que mulheres menopáusicas chegam a perder 2% do esqueleto, se não ingerirem quantidades ideais de cálcio. A osteoporose do tipo II acomete idosos de idade avançada, acima de 75 anos e está relacionada à ingestão inadequada de cálcio durante a vida. Acomete uma fração de 2 mulheres para cada 1 homem e, geralmente acarreta em fraturas trabecular e cortical de quadril (48, 50). A partir dos 40 anos, cada ciclo de remodelamento deixa um pequeno déficit no osso, pois os osteoblastos raramente repõem o osso reabsorvido exatamente igual ao ponto inicial (48, 50).

Além disso, podemos classificar a gravidade da osteoporose. Quando a DMO apresenta desvio padrão entre 0 e -1, consideramos uma DMO normal, sem nenhuma alteração. Quando os valores estão entre -1 e -2,5, consideramos um quadro de osteopenia (massa óssea reduzida). Valores abaixo de -2,5 diagnosticam osteoporose enquanto que valores abaixo de -2,5, somados a quadros de fraturas consideramos como osteoporose severa (50).

O sintoma mais evidente da osteoporose é a dor de forte intensidade causada por movimentos mínimos. Na coluna vertebral, a osteoporose pode provocar fraturas por compressão, causando fortes dores nas costas e é possível que o indivíduo fique “corcunda”, levando a uma diminuição na estatura (48, 50).

8. Riscos de Fratura

Em 2008, o World Health Organization Collaborating Center for Metabolic Bone Diseases, da Universidade de Sheffield, na Inglaterra, juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu uma ferramenta para auxiliar a avaliação do risco de fraturas ósseas, a FRAX (Fracture Risk Assessment Tool). Essa ferramenta correlaciona a densidade mineral óssea do fêmur com os fatores de risco que levam a osteoporose, proporcionando uma avaliação individual para cada paciente. Além de dados como idade, sexo, índice de massa corporal (IMC), os fatores de risco analisados pelo algoritmo são: histórico de fraturas por fragilidade óssea, histórico familiar de fratura de fêmur, fumo, uso prolongado de corticóides, artrite reumatóide entre outros (51). Isoladamente, cada fator de risco não é suficiente para detectar um paciente com baixa densidade óssea e com alto risco de fratura e, portanto, os dados devem ser analisados conjuntamente (Figura 7).

Os fatores de risco para osteoporose e fratura são aqueles que poderão influenciar na densidade mineral óssea (DMO), na arquitetura esquelética e na tendência a quedas. Com o avanço da idade, a espessura cortical, a densidade trabecular e a conectividade diminuem causando um enfraquecimento extremo dos corpos vertebrais e uma queda na capacidade de carga das vértebras, que pode chegar a uma redução de 90%.

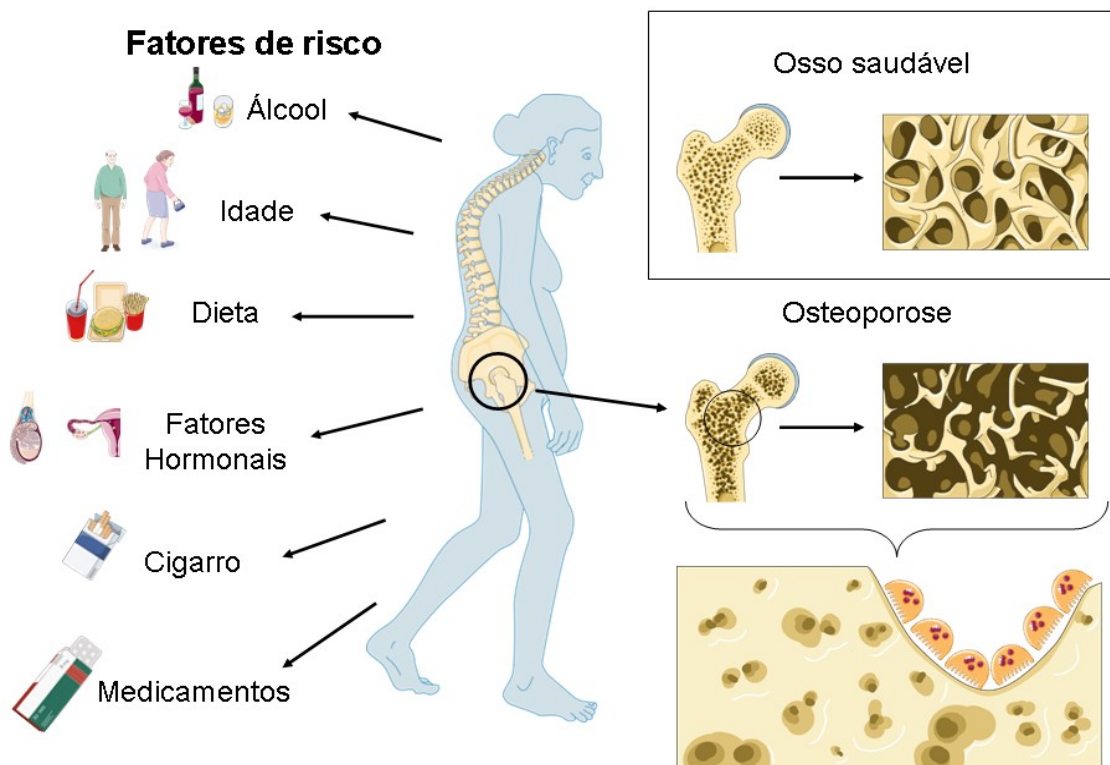


Figura 7. Osteoporose e fatores de risco. Vários fatores estão associados ao risco de osteoporose dentre eles a idade, sexo, excesso de medicamentos como os glicocorticóides, baixa ingestão de alimentos ricos em cálcio e vitamina D, entre outros.

A fratura óssea é caracterizada pela descontinuidade anatômica e instabilidade mecânica óssea. Ela pode ocorrer em decorrência de atividades dinâmicas, como os esportes ou acidentes ou por atividades passivas, por exemplo, as pequenas e leves quedas em pacientes com osteoporose (52). A fratura óssea pode ser classificada em simples, cominutivas ou fraturas por estresse. Na fratura simples, o osso é separado em dois fragmentos e está sujeito a flexão ou torção. Na fratura cominutiva, o osso é dividido em vários fragmentos (podendo se encontrar estilhaçado) e geralmente acontece em casos de acidentes de carro, quedas muito altas, etc. E a fratura por estresse é resultado de micro-danos agravados devido a forças de baixa magnitude que são aplicadas repetidamente por um longo período. A fratura por estresse, em pacientes saudáveis, pode ser facilmente reparada durante o remodelamento ósseo. Geralmente, as fraturas osteoporóticas ocorrem em locais do esqueleto formado por ossos trabeculares, como a região torácica, espinhas lombares, quadril e pulso como consequência de quedas ou perda da força motora. As mais graves fraturas osteoporóticas são fraturas de quadril, podendo levar o paciente antes completamente saudável a morbidade ou morte em apenas 6 meses.

Fatores como a idade, gênero e estilo de vida influenciam diretamente no risco de fratura osteoporótica. O envelhecimento acarreta na perda da DMO que, somado ao aumento da vulnerabilidade de indivíduos idosos, se torna um fator altamente relevante nos eventos de fratura osteoporótica, principalmente em idosos acima dos 60 anos (53). Durante a menopausa, as mulheres têm uma redução significativa na síntese de estrogênio que afeta diretamente o eixo RANK-RANKL-OPG, ocasionando um desequilíbrio na renovação óssea e, conseqüentemente, uma perda óssea considerável (54). Hábitos como o tabagismo, o consumo de bebidas alcoólicas, alimentação pobre em leites e seus derivados, entre outros fatores, estão associado à perda acelerada de massa óssea e ao aumento dos riscos de fratura em idosos. O tabaco afeta a absorção de cálcio no intestino enquanto que o consumo de caféina provoca o aumento da excreção de cálcio pelos rins (55, 56). O álcool interfere na regulação hormonal de hormônios importantes para o remodelamento ósseo, como o PTH. Sendo assim, seu consumo deve ser moderado (57). O consumo de derivados do leite proporciona a ingestão de cálcio necessária para manter os níveis desse íon suficientes para a formação dos nanocristais de hidroxapatita durante o processo de mineralização da matriz óssea (58).

9. Fármacos na recuperação óssea e osteoporose

Atualmente, a humanidade tem focado nos cuidados com a saúde e o bem-estar e desde então, pesquisas objetivando o tratamento da osteoporose, principalmente no desenvolvimento de novos fármacos, vem crescendo cada vez mais. No momento, várias classes de fármacos já são comercializadas para o tratamento da osteoporose, atuando de diferentes formas e com mecanismos de ação diferenciados. Sendo assim, podemos dividir esses fármacos em duas classes: os fármacos com ação anti-reabsortiva e fármacos com ação anabólica (59).

Os fármacos com ação anti-reabsortiva atuam basicamente nos osteoclastos, inibindo a sua atividade e, conseqüentemente a reabsorção óssea. Dentre eles, podemos destacar os bisfosfanatos (alendronate, risendronate, etidronate), os moduladores de receptores seletivos de estrogênio (SERMs) (agonistas/antagonistas de estrogênio), anticorpo monoclonal humano RANK-L (denosumab) e calcitonina. Já os fármacos com ação anabólica atuam na atividade dos osteoblastos, estimulando a formação de osso novo. Dentre eles, podemos citar os peptídeos de PTH (PTH 1-84, Teriparatide) (59).

Embora haja muitos fármacos já comercializados para o tratamento da osteoporose, os pesquisadores ainda buscam um fármaco mais eficiente, com menores efeitos colaterais e que necessite de doses menores das já administradas. Pensando nisso, podemos encontrar na literatura drogas em estudos *in vitro* e *in vivo* e outras drogas já em testes clínicos, como a os inibidores de catepsina-K (odanacatib, balicatib, relacatib, ONO5334, MV061194 MIV-701) e anticorpos anti-esclerostina (romosozumab, blosozumab).

10. Alternativas na terapia de reparo ósseo

O aumento crescente de fraturas fez-se necessário aumentar os investimentos em biomateriais para a recuperação de lesões ao tecido ósseo. A engenharia tecidual é um campo da ciência com especial interesse no desenvolvimento de biomateriais/scaffolds inspirados na composição e estrutura óssea objetivando materiais para enxerto ósseo e/ou reparo de fraturas. Para esses biomateriais se tornarem ideais para esta finalidade é necessário que eles tenham características específicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade, características específicas da estrutura óssea (por exemplo, porosidade, resistência e dureza) e propriedades osteoindutivas / osteocondutoras apropriadas para estimular a proliferação celular e a diferenciação osteogênica no local de cicatrização (60). Algumas estratégias podem ser adotadas no reparo ósseo utilizando os biomateriais. Os biomateriais podem ser implantados puros e diretamente no local da lesão ou podem receber células-tronco isoladas do próprio paciente e posteriormente serem implantados, já com uma quantidade necessária de células cultivadas sobre eles (60, 61).

Um biomaterial muito conhecido e utilizado no reparo do tecido ósseo é o titânio (Ti) e suas ligas. O titânio puro é utilizado com sucesso na odontologia desde 1965. Ele apresenta boas características como resistência à corrosão, força específica, biocompatibilidade e osseointegração. As ligas de Ti são capazes de suportar grande estresse mecânico, podendo ser facilmente empregadas na ortopedia, na forma de articulações artificiais, fixadores ósseos e fixadores espinhais (62).

Outro material muito empregado na engenharia tecidual são os polímeros. Estes podem ser naturais ou sintéticos. Polímeros naturais, como o colágeno tipo I, mimetizam a estrutura e as propriedades bioquímicas da matriz orgânica natural do órgão. O colágeno é a proteína mais abundante na matriz óssea e, por isso, é considerada um excelente material para produzir scaffolds objetivando a regeneração do tecido ósseo (60, 61). Entretanto, o colágeno puro não apresenta propriedades mecânicas miméticas ao tecido ósseo e, por isso, estão sendo

associados à outros materiais (biomateriais ou nanomateriais) que possam melhorar suas propriedades mecânicas (63). Além do mais, muitos trabalhos utilizam a própria matriz descelularizada do tecido a ser recuperado. A matriz extracelular descelularizada é rica em proteínas (colágeno e não colágenas), glicosaminoglicanos e fatores de crescimento. Esses componentes são determinantes para a diferenciação e manutenção do “cell fate” das células que compõem aquele tecido (64).

11. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de peptídeos com atividade anti-osteoporótica durante a diferenciação e maturação óssea e durante a maturação de células da medula óssea em osteoclastos, avaliar a citocompatibilidade de ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio em osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas e produzir e avaliar scaffolds a base de matriz extracelular de fígado funcionalizados com nanomateriais durante a maturação óssea.

12. Referências

1. Aziziyeh R, Amin M, Habib M, Garcia Perlaza J, Szafranski K, McTavish RK, et al. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. *Journal of Medical Economics*. 2019;22(7):638-44.
2. Aziziyeh R, Amin M, Habib M, Garcia Perlaza J, Szafranski K, McTavish RK, et al. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. *Journal of medical economics*. 2019;22(7):638-44.
3. Zhang Y, Sun D, Cheng J, Tsoi JKH, Chen J. Mechanical and biological properties of Ti-(0-25 wt%)Nb alloys for biomedical implants application. *Regenerative biomaterials*. 2020;7(1):119-27.
4. Vasconcellos R, Alvarenga EC, Parreira RC, Lima SS, Resende RR. Exploring the cell signalling in hepatocyte differentiation. *Cellular signalling*. 2016;28(11):1773-88.
5. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*. 2015;2015:421746.
6. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews*. 2013;34(5):658-90.
7. Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and histopathology*. 2004;19(4):1325-44.
8. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
9. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (*Osx*) is an upstream regulator of *Satb2* during bone formation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(38):32995-3002.
10. Fisher LJ, Goldney RD. Differences in community mental health literacy in older and younger Australians. *International journal of geriatric psychiatry*. 2003;18(1):33-40.
11. Bonucci E, Dearden LC. Matrix vesicles in aging cartilage. *Federation proceedings*. 1976;35(2):163-8.

12. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*. 2003;5(3):222-6.
13. Rutkovskiy A, Stenslokken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical science monitor basic research*. 2016;22:95-106.
14. Terajima M, Perdivara I, Sricholpech M, Deguchi Y, Pleshko N, Tomer KB, et al. Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(33):22636-47.
15. Poundarik AA, Boskey A, Gundberg C, Vashishth D. Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Scientific reports*. 2018;8(1):1191.
16. Unal M, Creecy A, Nyman JS. The Role of Matrix Composition in the Mechanical Behavior of Bone. *Current osteoporosis reports*. 2018;16(3):205-15.
17. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235(1):176-90.
18. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229-38.
19. Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, et al. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(41):30884-95.
20. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, de Blicck-Hogervorst JM, Klein-Nulend J. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;391(1):364-9.
21. van Tol AF, Schemenz V, Wagermaier W, Roschger A, Razi H, Vitiennes I, et al. The mechanoreponse of bone is closely related to the osteocyte lacunocanalicular network architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117(51):32251-9.
22. Intemann J, De Gorter DJJ, Naylor AJ, Dankbar B, Wehmeyer C. Importance of osteocyte-mediated regulation of bone remodelling in inflammatory bone disease. *Swiss medical weekly*. 2020;150:w20187.
23. Kogianni G, Mann V, Noble BS. Apoptotic bodies convey activity capable of initiating osteoclastogenesis and localized bone destruction. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23(6):915-27.
24. Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, Tsang K, Guenther A, You L. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(9):2412-23.
25. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(12):3071-85.
26. Marchisio PC, Cirillo D, Naldini L, Primavera MV, Teti A, Zamboni-Zallone A. Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures. *The Journal of cell biology*. 1984;99(5):1696-705.
27. Ishiyama K, Yashiro T, Nakano N, Kasakura K, Miura R, Hara M, et al. Involvement of PU.1 in NFATc1 promoter function in osteoclast development. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology*. 2015;64(3):241-7.
28. Biskobing DM, Fan X, Rubin J. Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture. *Journal of bone and mineral*

- research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research. 1995;10(7):1025-32.
29. Leung R, Wang Y, Cuddy K, Sun C, Magalhaes J, Grynypas M, et al. Filamin A regulates monocyte migration through Rho small GTPases during osteoclastogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(5):1077-91.
 30. Arianna C, Eliana C, Flavio A, Marco R, Giacomo D, Manuel S, et al. Rapid Rapamycin-Only Induced Osteogenic Differentiation of Blood-Derived Stem Cells and Their Adhesion to Natural and Artificial Scaffolds. *Stem cells international*. 2017;2017:2976541.
 31. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *The Journal of experimental medicine*. 1999;190(12):1741-54.
 32. Asagiri M, Sato K, Usami T, Ochi S, Nishina H, Yoshida H, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(9):1261-9.
 33. Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014;558:70-8.
 34. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Annals of clinical biochemistry*. 2018;55(3):308-27.
 35. Frost HM. Mechanical determinants of bone modeling. *Metabolic bone disease & related research*. 1982;4(4):217-29.
 36. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2017;23(3):268-80.
 37. Kazemzadeh-Narbat M, Rouwkema J, Annabi N, Cheng H, Ghaderi M, Cha BH, et al. Engineering Photocrosslinkable Bicomponent Hydrogel Constructs for Creating 3D Vascularized Bone. *Advanced healthcare materials*. 2017;6(10).
 38. Rouwkema J, Khademhosseini A. Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks. *Trends in biotechnology*. 2016;34(9):733-45.
 39. Zhang LY, Bi Q, Zhao C, Chen JY, Cai MH, Chen XY. Recent Advances in Biomaterials for the Treatment of Bone Defects. *Organogenesis*. 2020:1-13.
 40. Feng W, Guo J, Li M. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *Journal of oral biosciences*. 2019;61(1):16-21.
 41. Filgueira L. *Osteoclast Differentiation and Function* 2010.
 42. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2008;8(3):204-16.
 43. Miyamoto T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *The Keio journal of medicine*. 2011;60(4):101-5.
 44. Soysa NS, Alles N. Osteoclast function and bone-resorbing activity: An overview. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;476(3):115-20.
 45. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
 46. Dole NS. *Genetic Determinants of Skeletal Diseases: Role of microRNAs [Doctoral Dissertations]*: University of Connecticut - Storrs; 2015.
 47. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2006;17(12):1726-33.

48. Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2012;41(3):475-86.
49. Saville PD. Osteoporosis: disease or senescence? *Lancet*. 1968;1(7541):535.
50. Lane JM, Russell L, Khan SN. Osteoporosis. *Clinical orthopaedics and related research*. 2000(372):139-50.
51. Bastos-Silva Y, Aguiar LB, Pinto-Neto AM, Baccaro LF, Costa-Paiva L. Correlation between osteoporotic fracture risk in Brazilian postmenopausal women calculated using the FRAX with and without the inclusion of bone densitometry data. *Archives of osteoporosis*. 2016;11:16.
52. Ostertag A, Collet C, Chappard C, Fernandez S, Vicaut E, Cohen-Solal M, et al. A case-control study of fractures in men with idiopathic osteoporosis: fractures are associated with older age and low cortical bone density. *Bone*. 2013;52(1):48-55.
53. Hui SL, Slemenda CW, Johnston CC, Jr. Age and bone mass as predictors of fracture in a prospective study. *The Journal of clinical investigation*. 1988;81(6):1804-9.
54. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1996;11(3):337-49.
55. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1999;14(2):215-20.
56. Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. *Brazilian dental journal*. 2010;21(3):199-204.
57. Duggal S, Simpson ME, Keiver K. Effect of chronic ethanol consumption on the response of parathyroid hormone to hypocalcemia in the pregnant rat. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2007;31(1):104-12.
58. Fairweather-Tait SJ, Teucher B. Calcium bioavailability in relation to bone health. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift fur Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2002;72(1):13-8.
59. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10169):364-76.
60. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, et al. Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(3).
61. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in biomaterials*. 2019;8(4):223-37.
62. Hanawa T. Titanium-Tissue Interface Reaction and Its Control With Surface Treatment. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7:170.
63. Vieira S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM. Nanoparticles for bone tissue engineering. *Biotechnology progress*. 2017;33(3):590-611.
64. Vieira MS, Santos AK, Vasconcellos R, Goulart VAM, Parreira RC, Kihara AH, et al. Neural stem cell differentiation into mature neurons: Mechanisms of regulation and biotechnological applications. *Biotechnology advances*. 2018;36(7):1946-70.

CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE NOVAS MOLÉCULAS INIBIDORAS DA CATEPSINA K PARA TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

1. Introdução

A osteoporose é uma doença metabólica, sistêmica e progressiva, caracterizada pela redução da massa óssea e deterioração de sua microarquitetura. Na osteoporose, há um desequilíbrio na atividade dos osteoblastos, que se sobressai a atividade dos osteoclastos, refletindo no resultado final do processo de remodelamento ósseo, tornando os ossos porosos e mais susceptíveis à fratura. Os tratamentos farmacológicos da osteoporose focam nesse desequilíbrio, seja diminuindo a atividade dos osteoclastos, aumentando a atividade dos osteoblastos, ou atuando em ambos (1, 2).

Os agentes farmacológicos já aprovados e utilizados no tratamento da osteoporose são classificados em agentes anti reabsortivos e agentes anabólicos. Os agentes anti reabsortivos incluem os membros da família dos bisfosfonatos, ranelato de estrôncio, os SERMs e o denosumabe. O agente anabólico aprovado consiste no PTH, seus fragmentos e peptídeos análogos (3). Entretanto, apesar de haver já medicamentos em clínica, ainda não encontramos um fármaco isento de efeitos colaterais e ideal para uso prolongado e contínuo. Além disso, todos os medicamentos anti-reabsortivos atualmente aprovados causam uma redução paralela na formação óssea (3).

Um alvo promissor que vem despertando o interesse de pesquisadores na busca de novas substâncias ativas a serem usadas no combate da osteoporose é a catepsina K, uma protease expressa em grandes quantidades nas células dos osteoclastos. Muitas pesquisas relacionadas aos inibidores seletivos de catepsina K foram reportadas e estão sendo desenvolvidas por pesquisadores ao longo dos últimos anos (4).

1. 2. Catepsina K

As proteases lisossomais foram identificadas pela primeira vez na década de 20 e são denominadas catepsinas. A família das catepsinas é composta por 11 membros que se diferenciam quanto à estrutura, mecanismos catalíticos e quais proteínas clivam. Dependendo do aminoácido no sítio ativo que medeia a atividade catalítica da enzima, a família das catepsinas são divididas em cisteína (catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, X e W), aspartato (catepsinas D e E) e serina (catepsinas A e G) proteases (3). A família das catepsinas apresenta uma dobra estrutural e uma tríade de resíduos Cys-Asn-His conservada no local ativo (5).

Especificamente, a catepsina K (CatK) contém 3 sítios ativos para interações enzima-substrato denominados de S1, S2 e S3. O sítio S1 é o resíduo catalítico da enzima. É composto pelos resíduos de aminoácidos Gly23, Ser24, Gly64 e Gly65, e Cys25. O sítio S2 é altamente lipofílico e é composto pelos resíduos Met68, Ala133, Leu157, Ala160, Leu205 e Tyr67. O sítio S3 compartilha o resíduo Tyr67 com S2 e é formado predominantemente pelo Asp61 (6).

A CatK é uma cisteína protease lisossomal expressa pelos osteoclastos, com atividade seletiva em pH ácido, sendo capaz de degradar proteínas da matriz óssea incluindo o colágeno tipo I, que compõe 90% da matriz orgânica do osso, colágeno tipo II, osteopontina e osteonectina, que compõem os outros 10% da matriz orgânica (7). A CatK é capaz de clivar a hélice tripla e os telopeptídeos das fibras de colágeno do tipo I. Além disso, a CatK é capaz de clivar e ativar MMP-9, demonstrando ser uma protease fundamental na degradação da matriz óssea (6, 7).

Dados mostram que uma redução significativa na expressão da catepsina K é bem tolerada pelo organismo e apenas a perda total da atividade desta protease leva a condições clínicas (8). A expressão da CatK é regulada pela via RANKL-RANK. A ativação da via de sinalização RANKL-RANK estimula a expressão do NFATc1, que por sua vez, inicia a transcrição de CatK (9). Camundongos com osteoclastos deficientes na expressão de catepsina K exibem desmineralização óssea normal e apenas a reabsorção da matriz óssea é prejudicada. Indivíduos com picnodisostose (doença recessiva rara que atinge o sistema esquelético) apresentam osteoclastos com deficiência no gene da CatK (8). Os osteoclastos são incapazes de degradar as proteínas da matriz óssea e, como consequência, os pacientes com essa doença apresentam uma matriz óssea altamente mineralizada e elevada DMO (8). Semelhante aos indivíduos com osteopetrose, o osso dos pacientes com picnodisostose é de má qualidade e esses indivíduos apresentam alto risco de fraturas por fragilidade. Dito isso, antagonistas da catepsina K despertaram o interesse dos pesquisadores como terapia para a osteoporose, contudo, até o momento, ainda não há um medicamento inibidor da CatK aprovado pela FDA.

1. 3. Inibidores da Catepsina K

De modo geral, os inibidores da CatK apresentam estruturas químicas semelhantes (Figura 1). Os inibidores se diferenciam um dos outros por meio de modificações nas posições P1, P2 e P3 (Figura 1B). É comum encontrarmos grupos eletrofílicos na posição P1,

importantes na interação com o sítio 1 da enzima. Grupos aromáticos na posição P3 (que interagem preferencialmente com o sítio S3) se mostraram importantes na interação inibidor-enzima e são alvos de modificações na produção de novos inibidores de CatK. Além do mais, resíduos hidrofóbicos na posição P2 são propostos para interagir com o sítio S2 e também são alvos de modificações (10-12). Neste trabalho, as moléculas utilizadas foram baseadas no esqueleto molecular do Balicatib (fármaco utilizado para tratamento de osteoartrite e osteoporose) (Figura 1A), e as modificações se deram nos grupos da posição P3, com objetivo de avaliar se diferentes resíduos aromáticos iriam afetar significativamente o potencial de inibição dessas substâncias.

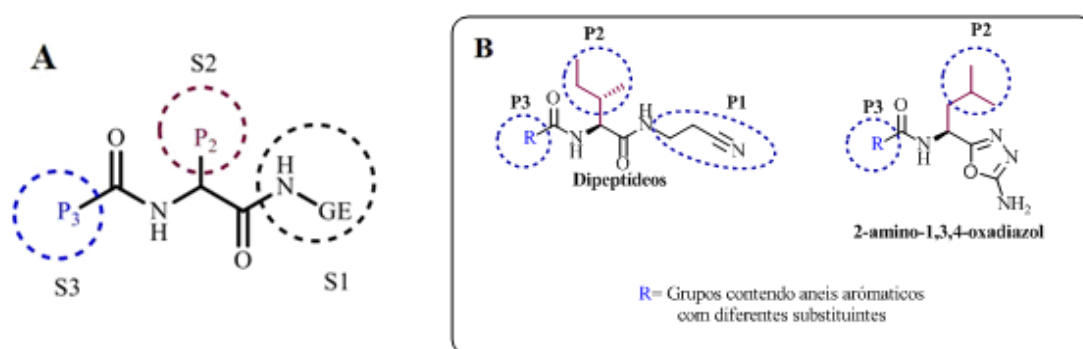


Figura 1. Representação esquemática da interação dos inibidores com os sítios ativos da catepsina K. A. Esqueletos moleculares de inibidores da catepsina K juntamente com seus sítios ativos S1, S2 e S3 e as principais regiões de modificação da molécula em P2 e P3. B. Esqueletos moleculares de dipeptídeos utilizados na produção de seus derivados e esqueletos moleculares de amino-oxadiazóis. *Fonte: Talita Bárbara Gontijo.*

O principal foco das empresas farmacêuticas é a porção tiol da cisteína de CatK. A interação do fármaco com essa porção deverá inibir reversivelmente ou inativar irreversivelmente a atividade proteolítica da CatK (5). O Odanacatib (ODN) é o único inibidor da CatK candidato à fármaco que demonstrou eficiência terapêutica em pacientes com osteoporose pós-menopausa. Foi desenvolvido pela Merck & Co., os estudos clínicos chegaram até a Fase III e o seu desenvolvimento foi interrompido pois apresentou efeitos cardio-cerebrovasculares adversos. Esses dados indicam que o ODN atua de forma sistêmica e pode inibir a CatK em locais diversos, além do tecido ósseo (5).

De forma geral, os agentes anti reabsortivos reduzem o número de osteoclastos. Em contrapartida, os inibidores da catepsina K são pensados para diminuir a função dos osteoclastos, mantendo ou aumentando o número de osteoclastos no nicho ósseo. O principal fator que incentiva as pesquisas nos inibidores da CatK é a preservação da formação e da sobrevivência dos osteoclastos com o uso desta terapia. Desta forma, não há maior

comprometimento do crosstalk entre osteoblastos e osteoclastos e não há prejuízos evidentes na formação e maturação dos osteoblastos e no remodelamento ósseo. Dados mostram que a deleção da catepsina K, em camundongos, levou ao aumento da produção de S1P (esfingosina-1-fosfato) pelos osteoclastos mutantes. A S1P, um lisofosfolípido biologicamente ativo, controla o tráfego de precursores de osteoclastos, sendo fundamental na regulação da osteoclastogênese, além de estimular a migração e sobrevivência dos osteoblastos (13, 14). As moléculas analisadas neste trabalho são extremamente atrativas para o tratamento da osteoporose visto que foram sintetizadas objetivando a interação com o sítio ativo da CatK, inibindo sua atividade catalítica. Desta forma, as moléculas não comprometem a viabilidade dos osteoclastos e o crosstalk entre essas células e os osteoblastos. Até o momento, não há fármacos inibidores da catepsina K aprovados pela FDA e este trabalho propõe testar os efeitos na manutenção da atividade osteoblástica e na atividade osteoclástica de 17 moléculas inéditas desenhadas para se comportarem como inibidoras da catepsina K.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de derivados dipeptídeos e amino-oxadiazóis baseados em inibidores da catepsina K durante a maturação de osteoblastos e osteoclastos de roedores e durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade e diferenciação de hASC na presença das moléculas inibidoras da catepsina K;
- Avaliar a viabilidade e maturação de rOB e mOB na presença das moléculas inibidoras da catepsina K;
- Avaliar a viabilidade de HSC durante a osteoclastogênese na presença das moléculas inibidoras da catepsina K;
- Avaliar a osteoclastogênese de HSC na presença das moléculas inibidoras da catepsina K;

3. Material e Métodos

3.1. Novas moléculas inibidoras da catepsina K

As moléculas analisadas neste trabalho foram produzidas durante o doutorado da aluna Talita Bárbara Gontijo, sob orientação da professora Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas, do departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A síntese das moléculas foi realizada de modo que estas se comportassem como inibidoras da CatK. Para isso, foram realizadas modificações nos esqueletos moleculares de dipeptídeos e amino-oxadiazóis (Figura 2).

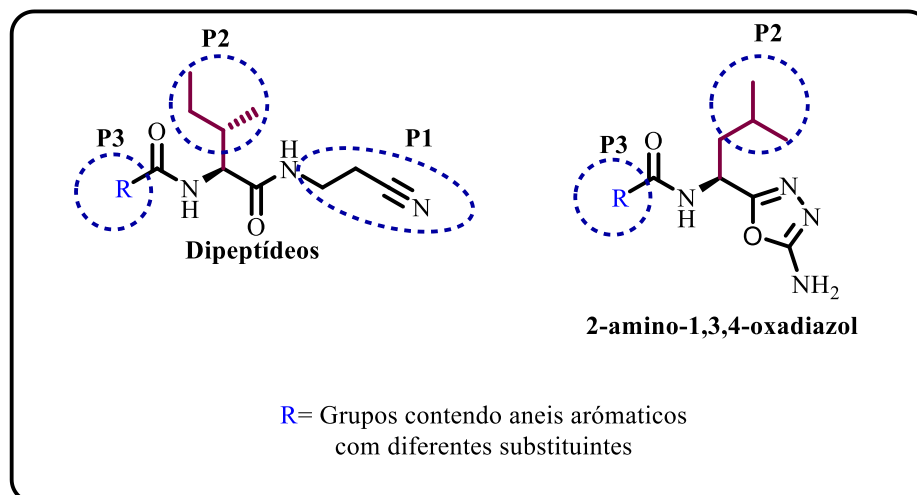


Figura 2. Estruturas gerais dos compostos testados neste trabalho. Os compostos utilizados neste trabalho receberam modificações (representadas por R) na região P3 dos esqueletos moleculares de dipeptídeos e amino-oxadiazóis.

3.2. Comitê de Ética

Os ensaios de citocompatibilidade, maturação celular e diferenciação *in vitro* foram realizados com a cultura primária de osteoblastos extraídos do calvário de ratos Wistar (n=5), camundongos C57/bl6 (n=5) neonatos com 3 a 5 dias de idade (15) e com células-tronco mesenquimais humanas extraídas de tecido adiposo (15). O uso dos osteoblastos oriundos dos ratos Wistar foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) sob protocolo 009/2018. O uso dos osteoblastos oriundos dos camundongos C57/bl6 foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob protocolo 288/2014. O uso das células-tronco mesenquimais foi aprovado pelo comitê de ética da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (C.A.A.E) 266.925.

3.3. Extração de osteoblastos

Ratos Wistar neonatos de 3 a 5 dias e camundongos C57bl/6 foram eutanasiados por dose letal de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Cristália). Em seguida, foi feito um recorte bilateral das peles dos animais, a partir da rima ocular até as orelhas, possibilitando a exposição das calvárias. Após a retração da pele, as calvárias foram recortadas na região de

sutura ao redor dos ossos parietais, destacadas e armazenadas em tampão fosfato salino (PBS) contendo 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®) e 1mg/mL de estreptomicina (Gibco®). Posteriormente, as calvárias foram fragmentadas com o auxílio de uma tesoura e submetidas a tratamento enzimático em 1% de tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Gibco®) por 10 min. Em seguida, as amostras foram incubadas com 2% de colagenase (Millipore®), em 4 banhos sequenciais, por 20 min cada a 37 °C. Os últimos três banhos de colagenase foram centrifugados e o pellet foi ressuspensão em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM (Gibco®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), penicilina (100 UI / ml - Gibco®) e estreptomicina (100 mg / ml - Gibco®) e transferido para frascos de cultura de células T25. As células foram levadas a crescer em uma incubadora a 37 ° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Todos os experimentos foram conduzidos na quinta passagem celular.

3.4. Extração de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC)

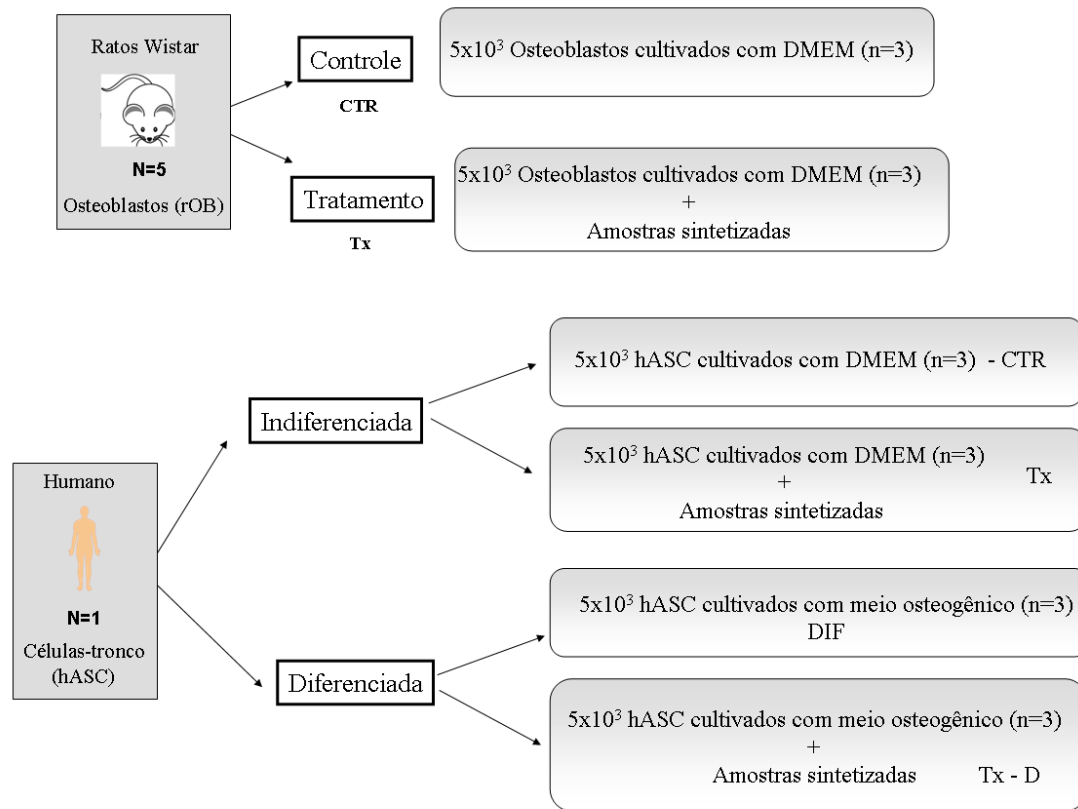
As células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) foram extraídas de lipoaspirado de paciente do sexo masculino, de 42 anos, 115 quilos, 183 centímetros de altura, que se submeteu ao procedimento de lipoaspiração. A clínica responsável pelo procedimento foi a Clínica Patrícia Leite, e as cirurgias foram realizadas no Hospital LifeCenter, localizada no bairro Serra, em Belo Horizonte e coordenada pela Dra. Patrícia Leite e os procedimentos foram seguidos de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Parecer nº ETIC - 0107.0.203.000-10). O material foi cedido ao Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia da UFMG.

O lipoaspirado foi retirado dos flancos direito e esquerdo e regiões infra e supraumbilical, transferido para recipientes de 200 mL de vidros contendo 1 mg/mL de estreptomicina (Gibco®), 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®) e 3 µg/ mL de gentamicina (Gibco®) transportado para o Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia para processamento em fluxo laminar, em condições estéreis, conforme descrito por Zuk et al. (16). O lipoaspirado foi separado em porções de aproximadamente 20 mL em tubos falcon estéreis de 50 mL e lavado com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM (Gibco®) sem soro sobre centrifugação de 252x g por 6 minutos a temperatura ambiente (16). Após a centrifugação, a porção superior contendo a gordura foi separada e submetida à digestão com colagenase do tipo I (Millipore®) em uma concentração

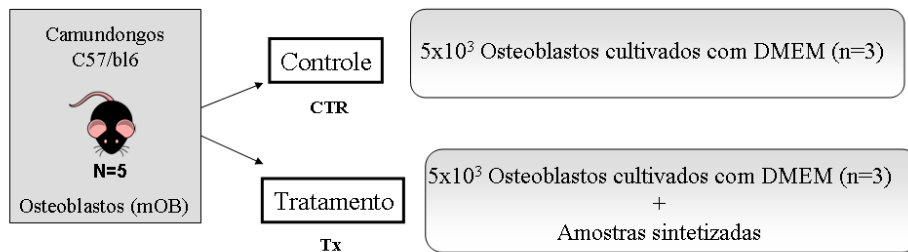
de 0,1% em PBS, pH 7,4, na proporção de 1:1 para digerir a matriz extracelular. Os tubos foram mantidos a 37°C, 5% CO₂ por duas horas e a cada 15 minutos, os tubos foram agitados vigorosamente. Seguida as duas horas de digestão, os tubos foram centrifugados 252 g por 6 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi descartado e a porção estromal foi ressuspensa em meio DMEM completo (10% SFB (Gibco®), 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®), 1 mg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 3 µg/ mL de gentamicina (Gibco®)). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias para retirada de gotículas de gordura, células sanguíneas e células não aderentes.

3.5. Grupos Experimentais

O fluxograma abaixo sintetiza os grupos experimentais utilizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos e em hASC.



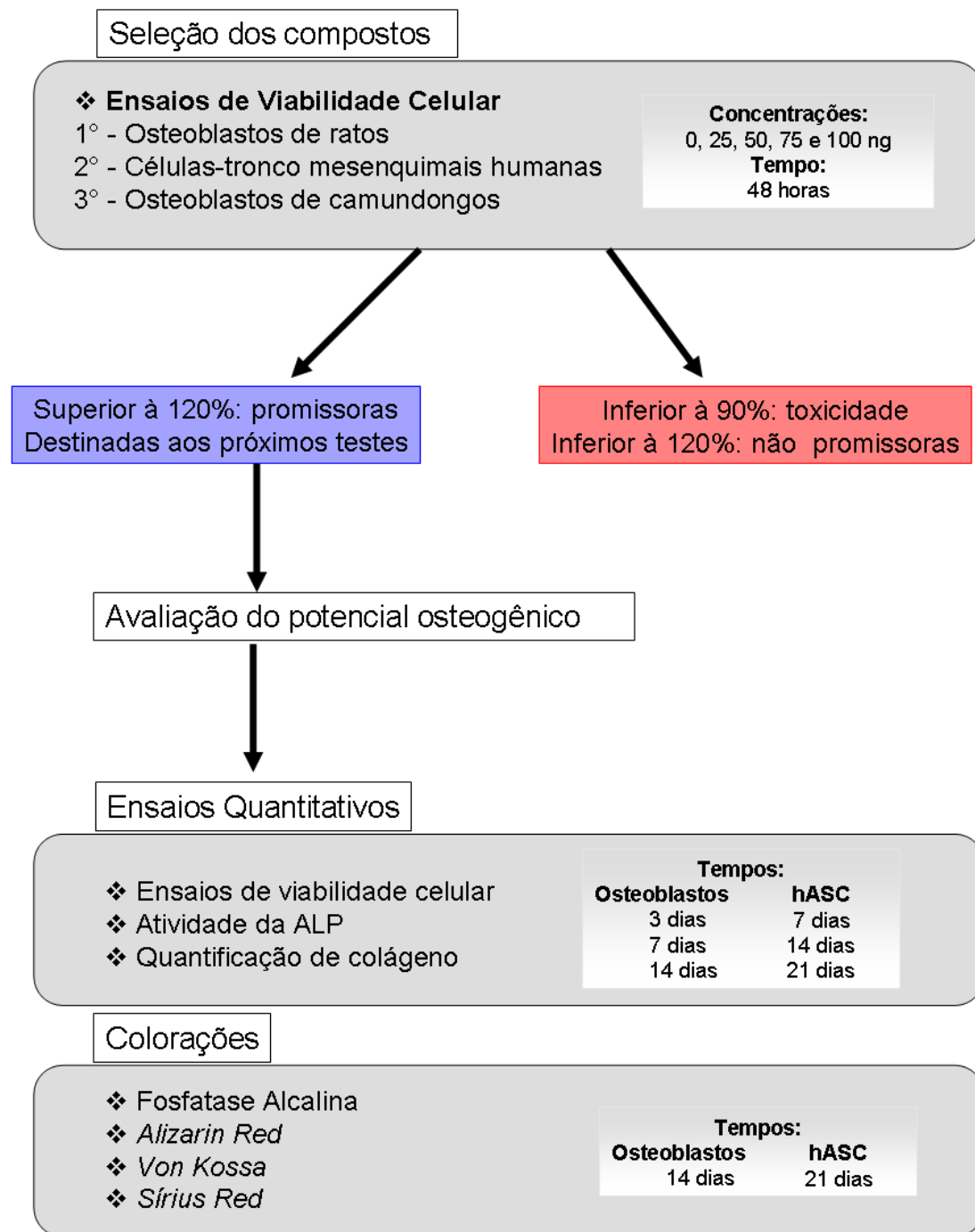
Meio osteogênico: DMEM + 1 μ M Dexametasona, 100 mM de β -glicerol-fosfato e 0,2 mM de ácido ascórbico



Fluxograma 1. Resumo dos grupos experimentais utilizados neste capítulo.

3.6. Teste de citocompatibilidade em osteoblastos e hASC

O fluxograma abaixo sintetiza os experimentos realizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos e em hASC, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos.



Fluxograma 2. Resumo dos experimentos realizados neste capítulo com osteoblastos de ratos e hASC.

3.6.1. Viabilidade celular

Os osteoblastos foram semeados na concentração de 5×10^3 em cada amostra com meio de cultura DMEM (Gibco®) suplementado. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias e, nos dias 3, 7 e 14, 10% (v / v) do Reagente Resazurina (Sigma-Aldrich) foi adicionado aos poços. Por sua vez, as células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo

humano (hASC) foram semeadas na concentração de 5×10^3 células em cada amostra com meio de cultura DMEM (Gibco®) suplementado e meio de cultura DMEM (Gibco®) enriquecido com fatores indutores de diferenciação osteogênica ($1 \mu\text{M}$ de Dexametasona (Calbiochem), 100 mM de β -glicerol-fosfato (Sigma-Aldrich) e $0,2 \text{ mM}$ de ácido ascórbico (Merck)). O meio de cultura foi renovado a cada 3-4 dias e, nos dias 7, 14 e 21 10% (v / v) do Reagente Resazurina (Sigma-Aldrich) foi adicionado aos poços. Após a adição do reagente, as placas foram mantidas a 37°C , 5% CO_2 por quatro horas. Em seguida, a densidade ótica foi mensurada no comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro para microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®).

3.6.2. Atividade da Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi avaliada usando o ensaio BCIP-NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/ nitro blue tetrazolium) (Invitrogen). $300\mu\text{l}$ dos sobrenadantes de cada poço foram removidos nos dias 3, 7 e 14, nos experimentos com osteoblastos e nos dias 7, 14 e 21, nos experimentos com hASC e armazenados em Eppendorfs de $1,5 \text{ mL}$. Os poços foram lavados com PBS e, em seguida, $200 \mu\text{l}$ de solução BCIP-NBT, que foi preparada de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, foram adicionados aos sobrenadantes de cada poço. Após 2 horas de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , a densidade ótica foi mensurada no comprimento de onda em 595 nm no espectrofotômetro para microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®) (17).

3.6.3. Produção de colágeno

Nos dias 3, 7, 14 e 21, os sobrenadantes foram coletados para avaliar a produção de colágeno pelas células durante a maturação e diferenciação das células. As análises foram realizadas pelo ensaio colorimétrico usando o corante Direct Red 80 (Sigma-Aldrich). Para isso, $25 \mu\text{L}$ do meio de cultura foram transferidos para Eppendorfs de $1,5 \text{ mL}$ e posteriormente foram adicionados em $200 \mu\text{L}$ de uma solução do reagente (1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico (Vetec) e ácido pícrico sólido (Vetec)) por 1 hora, sob leve agitação, à temperatura ambiente e protegido da luz. Após 1 hora, a solução foi centrifugada à 10000 r.p.m. e o pellet foi lavado em uma solução de $0,1 \text{ mol/L}$ de ácido acético (Sigma-Aldrich). Em seguida, o pellet foi solubilizado pela adição de $150\mu\text{l}$ de NaOH (Vetec) $0,1 \text{ mol/L}$. Em seguida, densidade ótica foi mensurada no comprimento de onda em 550 nm no espectrofotômetro para microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®). O colágeno extraído das caudas dos ratos foi utilizado para realizar a curva padrão.

3.6.4. Coloração por *Alizarin red S*

Para avaliar a deposição de cálcio nas amostras e, conseqüentemente, a diferenciação celular, após os 14 dias, para os osteoblastos e após 21 dias de cultivo, no caso das hASC, realizou-se incubação das culturas com *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com PFA (paraformaldeído) 4% (Sigma-Aldrich) gelado por 20 min. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada estéril duas vezes e coradas 30 minutos com 500 µL de Solução de *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich). O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas e a coloração dos depósitos minerais de cálcio foi registrada em microscópio óptico (Primovert, Zeiss, German).

3.6.5. Coloração por *Von Kossa*

Após os 14 e 21 dias de cultivo, a mineralização foi avaliada pela coloração de *Von Kossa*. O meio foi retirado e as células foram fixadas com PFA (Sigma-Aldrich) 4% gelado por 20 min. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada estéril duas vezes e foram adicionados 500 µL de nitrato de prata (Vetec) 5% (p/v) e a placa foi exposta à luz UV por 60 minutos. A placa foi então lavada por 10 minutos com PBS e imersa em tiosulfato de sódio (Sigma-Aldrich) 5% (p/v), por 3 minutos. O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas e a coloração dos depósitos minerais foi registrada em microscópio óptico (Primovert, Zeiss, German).

3.6.6. Coloração por *Sírius red*

No último dia de ensaio, as células foram fixadas com PFA (Sigma-Aldrich) 4% e coradas para visualização da produção de colágeno pelas células. Após a fixação, as células foram lavadas e coradas com uma solução de vermelho *Sírius* (1% em solução aquosa saturada de ácido pícrico (Vetec) e ácido pícrico sólido (Vetec)) por 1 hora, sob leve movimento à temperatura ambiente e protegida da luz. Após a coloração, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com ácido clorídrico (HCl) (Sigma-Aldrich) 0,01 mol/L para remoção do excesso de corante. A coloração do colágeno produzido foi registrada em microscópio óptico (Primovert, Zeiss, German).

3.7. Isolamento dos precursores de osteoclastos

Os precursores de osteoclastos foram isolados segundo protocolo estabelecido por Marino *et. al* (18) (Figura 3). Resumidamente, camundongos C57bl/6 neonatos foram eutanasiados e limpos com álcool 70% e solução de iodopovidona (Bioquímica). Os membros posteriores foram recolhidos e transferidos para uma placa de Petri estéril no gelo, onde foram cuidadosamente removidos os tecidos moles. Os ossos limpos foram colocados em uma nova placa de Petri preenchida com meio de cultura DMEM (Gibco®) e armazenada por 30 minutos em uma incubadora (5% CO₂, 37° C) para permitir atingir o pH e temperatura corretos. Em seguida, os ossos foram cortados na região da epífise, colocados em um Eppendorf de 500ul, no qual o fundo foi previamente removido. O Eppendorf de 500 ul foi colocado dentro de um Eppendorf de 1,5 ml e centrifugado por 30s a 10000 g à temperatura ambiente. O pellet foi suspenso em tampão de lise. A suspensão de células da medula óssea foi centrifugada em 300 g por 3 min, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura e as células foram armazenadas em placas de cultura sem tratamento.

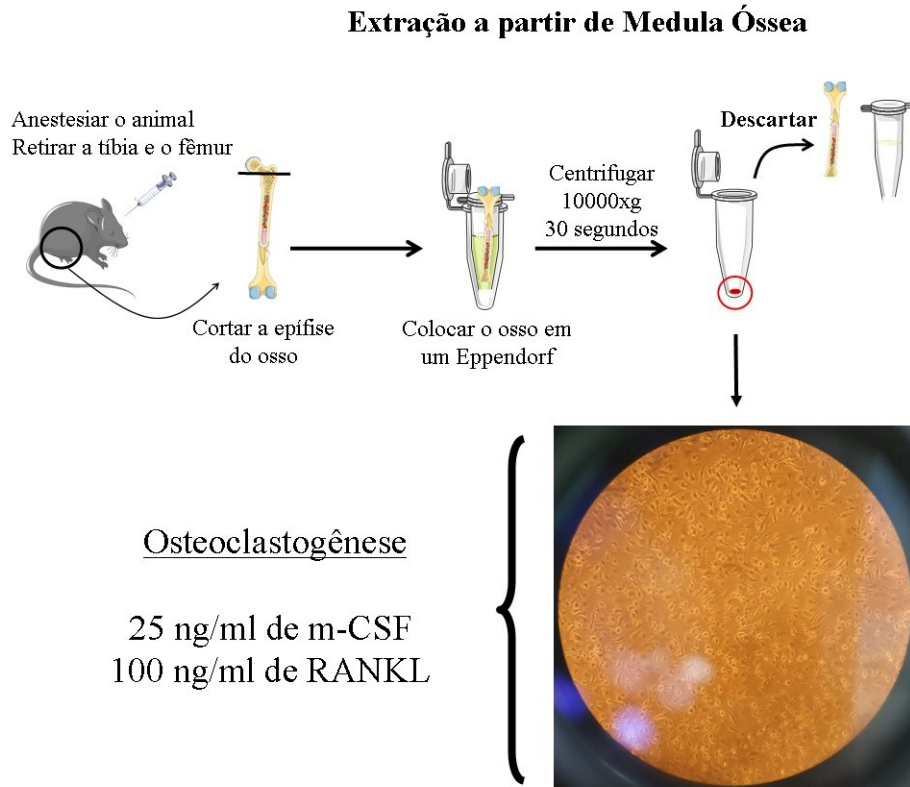
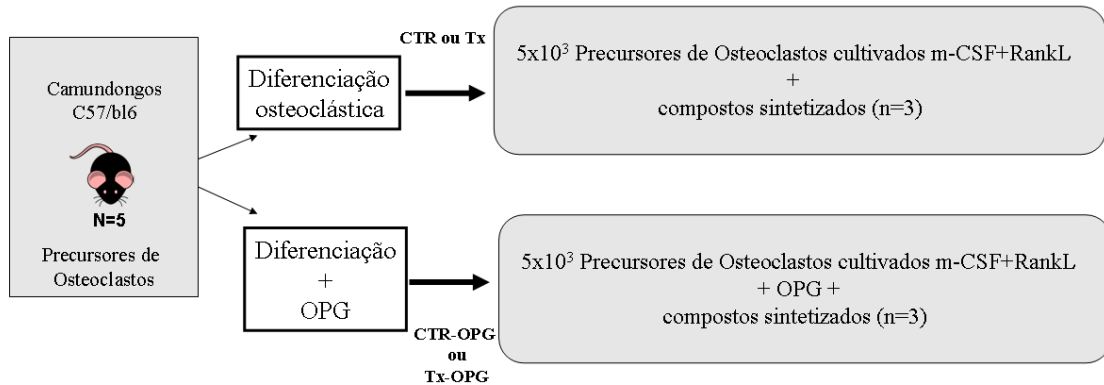


Figura 3. Processo de extração dos precursores de osteoclastos. Os osteoclastos foram extraídos da medula óssea de tíbias de camundongos C57bl/6 de acordo com Marino *et. al* (18).

O fluxograma abaixo sintetiza os experimentos realizados neste capítulo em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos.

Grupo Experimental

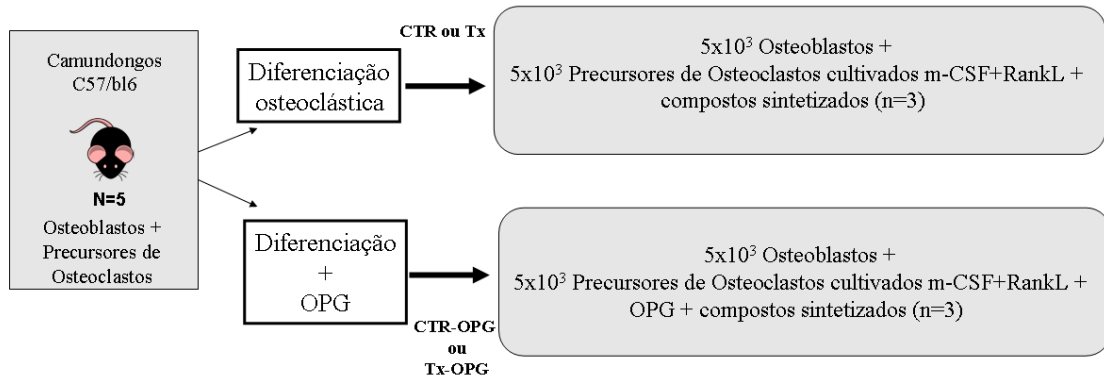


Ensaio Experimentais

- ❖ Viabilidade
- ❖ Exposição ao substrato TRAP
- ❖ Coloração por TRAP

Tempos:
7 dias

Grupo Experimental



Ensaio Experimentais

- ❖ Viabilidade
- ❖ Atividade da fosfatase alcalina
- ❖ Concentração de colágeno
- ❖ Coloração por TRAP
- ❖ Coloração por Von Kossa

Tempos:
7 dias

Fluxograma 3. Resumo dos experimentos com células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6 utilizados neste capítulo.

3.8. Diferenciação osteoclástica

Foram semeados 5x10³ células precursoras de osteoclastos em placas de 48 wells e cultivadas por 7 dias com meio DMEM (Gibco®) suplementado e enriquecido com 25 ng/ml de m-CSF (Bioalbra) e 10 ng/ml de RANKL (Bioalbra). Metade do meio de cultura foi

renovado a cada 48 horas. Durante a diferenciação dos osteoclastos, foram adicionados os peptídeos selecionados juntamente com 10ng/ml de osteoprotegerina (OPG) (Biolegend) (18). A OPG atua como controle negativo, visto que a OPG impede a ligação do RANK ao seu ligante RANKL e, conseqüentemente, inibe a formação e a atividade dos osteoclastos.

3.9. Coloração por TRAP

Após os 7 dias de diferenciação, os osteoclastos foram fixados com PFA (Sigma-Aldrich) 4% por 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 2x com PBS e os poços foram secos. Após a secagem, as células foram incubadas durante 30 min com 100 µl de substrato TRAP (substrato fosfatase, cat # P4744, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em tampão contendo 50 mM de citrato de sódio/ 10 mM de tartarato de sódio (Sigma-Aldrich), pH 4,6. Após 30 min foi adicionado 100 µl de NaOH (Vetec) 0,1 N e a absorbância foi mensurada em 410 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®). Para observar a formação de células multinucleadas, as células foram fixadas com PFA (Sigma-Aldrich) 4% por 20 min e posteriormente as células foram coradas durante 4 horas com 200 µL de solução de reação TRAP (5 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma-Aldrich) dissolvido em 0,5 ml de N, N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich)) solubilizados em 50 ml de tampão composto por 100mM de acetato de sódio/50mM de tartarato de sódio (Sigma-Aldrich) pH 5,0 e 30 mg de Fast Violet LB (Sigma-Aldrich). Foram consideradas células diferenciadas as células com três ou mais núcleos (19).

3.10. Ensaio de co-cultura

Foram semeadas 5×10^3 osteoblastos de camundongos C57bl/6 em placas de 96 wells. Após 24 horas, 5×10^3 células precursoras de osteoclastos foram semeados nesses mesmos poços e ambas as células foram cultivadas por 7 dias com meio DMEM (Gibco®) suplementado e enriquecido com 25 ng/ml de m-CSF (Bioalbra) e 100 ng/ml de RANKL (Bioalbra). Após os 7 dias de cultivo, foram avaliados a viabilidade dessas células e a atividade da fosfatase ácida. Os poços foram corados por TRAP e pela coloração Von Kossa (Conforme descrito anteriormente) (20, 21).

3.11. Análise qualitativa das fotomicrografias.

As análises qualitativas das colorações *Alizarin Red S*, *Von Kossa* e *Sírius Red* foram realizadas na objetiva por meio de um Score elaborado, utilizando o parâmetro definido na tabela 1.

Tabela 1. Legenda do score da intensidade das colorações utilizadas para comparação entre as diferentes amostras utilizadas:

Score	Intensidade da coloração nas células
-	Ausência
+	Mínimo
++	Pouco
+++	Moderada
++++	Elevada

3.12. Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos foram representados pela média \pm o desvio padrão. A significância estatística foi determinada usando o teste t de *Student't* não pareado e o teste ANOVA utilizando-se GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, Software GraphPad, La Jolla California, USA.

4. Resultados

4.1. Seleção das moléculas

Foram produzidas 17 amostras para o estudo. A fim de selecionar as amostras mais promissoras e padronizar a concentração ideal de cada amostra durante os ensaios subsequentes, foi realizado um ensaio de viabilidade, utilizando os osteoblastos de ratos neonatos Wistar (rOB), as células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) e os osteoblastos de camundongos neonatos C57bl/6 (mOB). Todas as células foram expostas aos compostos durante 48 horas e, após o período de exposição, a viabilidade foi mensurada. Os dados foram normalizados para porcentagem e a viabilidade das células que não foram expostas às amostras (ou seja, as células que receberam a concentração de 0ng) foi considerada os controles positivos (100%). As amostras nas quais as células apresentaram viabilidade inferior a 90% foram consideradas amostras citotóxicas. As amostras nas quais as células apresentaram viabilidade inferior a 120% não foram consideradas amostras promissoras, visto que as amostras aumentaram a atividade metabólica das células. As amostras foram identificadas como: T10, T15, T18, T20, T23, T24, T27, T28, T30, T32, T35, T38, T44, T45, T46, T47 e T48.

Primeiramente, os rOB foram expostos às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 ng/ml de cada amostra. Após 48 horas de exposição, a viabilidade dos rOB foi mensurada utilizando

o reagente resazurina e a concentração de cada amostra foi estabelecida (Tabela 2). Tendo em vista os resultados, a amostra 47 (destacado em vermelho) não foi considerada uma amostra promissora, pois apresentou viabilidade inferior a 120% em todas as concentrações amostrais e, portanto, foram excluídas do nosso estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Viabilidades das rOB após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
T10	100	189,812	207,752	185,915	225,251
T15	100	212,295	243,862	214,095	237,372
T18	100	211,242	244,24	209,224	245,141
T20	100	217,54	231,169	200,278	219,161
T23	100	231,555	265,722	209,955	246,835
T24	100	202,029	226,137	218,522	237,212
T27	100	226,822	252,894	231,371	246,768
T28	100	209,955	244,652	222,677	242,79
T30	100	171,149	226,44	197,331	206,737
T32	100	164,728	239,822	187,046	204,359
T35	100	186,626	222,07	184,851	204,87
T38	100	212,042	215,243	204,483	251,22
T44	100	90,6543	127,698	120,251	120,63
T45	100	103,858	120,163	97,8285	95,6783
T46	100	195,992	250,011	224,338	209,663
T47	100	116,007	109,128	112,801	104,109
T48	100	236,269	223,192	254,642	237,866

Em seguida, as hASC foram expostas as concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 ng/ml das amostra. Após 48 horas de exposição, a viabilidade das hASC foi mensurada por meios do reagente resazurina e a concentração de cada amostra foi estabelecida (Tabela 3). As amostras 23 e 28 (destacadas em azul) foram excluídas do nosso estudo, pois apresentaram viabilidade inferior a 90% e, portanto, foram consideradas citotóxicas. Além do mais, as amostras 15, 18 e 24 (destacado em vermelho) não foram consideradas moléculas promissoras, pois apresentaram viabilidade inferior a 120% e, portanto, foram excluídas das nossas análises (Tabela 3).

Tabela 3. Viabilidades das hASC após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
T10	100	128,3191	144,9534	134,2009	78,69234
T15	100	95,68092	98,02066	100,2935	98,65898
T18	100	91,62641	106,1404	81,52422	68,92776
T20	100	106,5594	104,3222	136,058	103,0877
T23	100	73,0323	81,56377	77,03402	88,17926
T24	100	104,7984	91,43018	76,06127	94,12458
T27	100	93,09399	120,2327	81,4265	65,82021
T28	100	70,50416	79,78329	87,61451	57,58783
T30	100	76,33788	120,782	123,0628	90,11284
T32	100	135,0044	123,5051	141,5256	118,3334
T35	100	132,0557	120,8824	133,493	80,93476
T38	100	131,232	147,7498	142,239	100,8459
T44	100	39,7957	94,78666	133,0625	61,13697
T45	100	73,98035	137,7537	100,9897	99,47226
T46	100	56,51068	144,3336	61,06066	85,43026
T48	100	117,9596	133,2463	118,3324	71,82707

Em seguida, os mOB foram expostos às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 ng/ml das amostras. Após 48 horas de exposição, a viabilidade dos osteoblastos de camundongos (mOB) foi mensurada por meio do reagente resazurina e a concentração de cada amostra foi estabelecida (Tabela 4). Tendo em vista a viabilidade das amostras serem superior a 120%, todas as amostras foram consideradas promissoras.

Tabela 4. Viabilidades das mOB após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
T10	100	117,76	119,996	91,1113	128,763
T20	100	135,767	164,265	88,1121	79,049
T27	100	142,768	143,31	88,3023	200,385
T30	100	162,22	147,366	111,971	234,106
T32	100	111,619	81,074	95,5737	140,684
T35	100	128,864	148,429	117,039	180,495
T38	100	189,247	171,243	134,666	2,04467
T44	100	143,71	114,865	125,241	232,378
T45	100	112,119	162,588	103,725	184,964
T46	100	212,553	130,989	138,405	214,311
T48	100	173,328	198,925	173,868	197,484

A partir dos ensaios de viabilidade, foi determinada a concentração que cada molécula seria utilizada nos ensaios seguintes conforme Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de uso de cada molécula selecionada por modelo celular.

Amostras	Concentração Uso		
	rOB	hASC	mOB
T10	100 ng	50 ng	100 ng
T20	50 ng	75 ng	50 ng
T27	50 ng	50 ng	100 ng
T30	50 ng	75 ng	100 ng
T32	50 ng	75 ng	100 ng
T35	50 ng	75 ng	100 ng
T38	100 ng	50 ng	25 ng
T44	50 ng	75 ng	100 ng
T45	50 ng	50 ng	100 ng
T46	50 ng	50 ng	100 ng
T48	75 ng	50 ng	50 ng

Determinado a concentração ideal de cada molécula nos tipos celulares específicos, foi avaliado inicialmente o potencial osteogênico de cada molécula nos rOB.

4.2. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos de ratos Wistar (rOB)

Para avaliar o citotoxicidade em tempo prolongado de exposição às amostras, avaliou-se a viabilidade celular com 7 e 14 dias de cultura. Após 7 dias de cultivo, observamos uma menor viabilidade nos osteoblastos cultivados com as amostras T44 quando comparadas aos controles (Figura 6A). No final de 14 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com as amostras T32 e T44 apresentaram menor viabilidade quando comparados aos controles (Figura 6B). Esses resultados sugerem que os compostos T32 e T44 são citotóxicos para esse modelo celular.

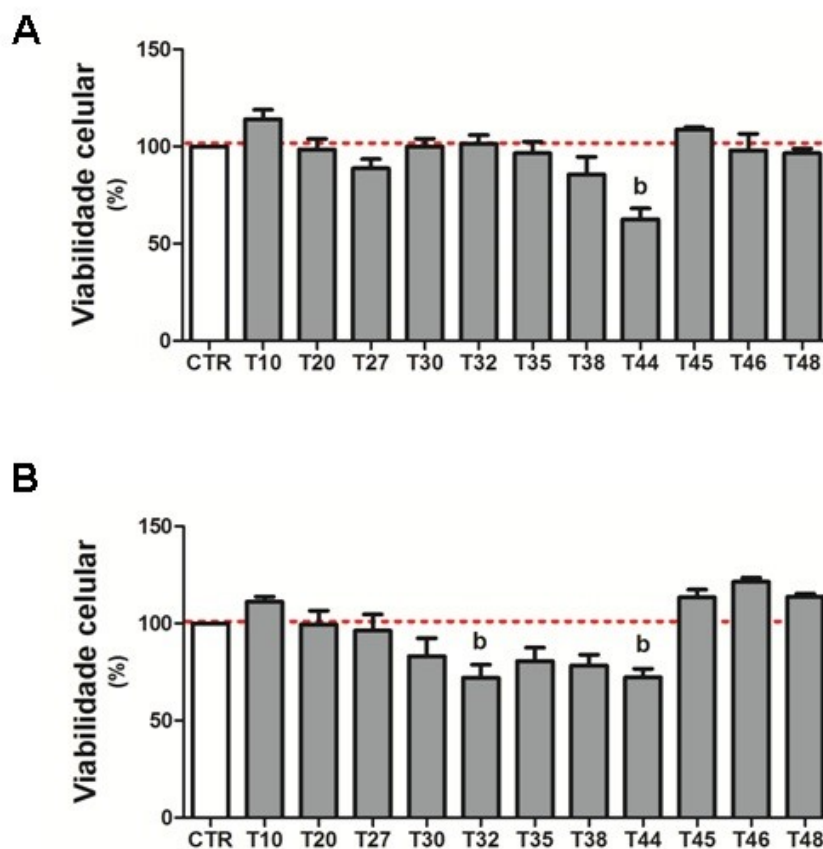


Figura 6. Viabilidade dos rOB. Viabilidade dos rOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias e **B.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. b: significativamente menor que o controle (CTR).

Para avaliar se as amostras influenciavam a atividade da ALP liberada, os rOB foram cultivados e mantidos por 3, 7 e 14 dias de exposição às amostras. Após 3 dias de cultivo, observamos uma maior atividade da fosfatase alcalina (ALP) nos osteoblastos expostos com a amostra T27, T32 e T45 quando comparados aos controles (Figura 7A). Em 7 dias de cultivo, não foi encontrado diferenças significativas entre as amostras (Figura 7B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com a amostra T10 apresentaram atividade da ALP significativamente

maior quando comparados aos controles (Figura 7C). Esses dados mostram que os compostos T10 e T45 apresentam potencial osteoindutor.

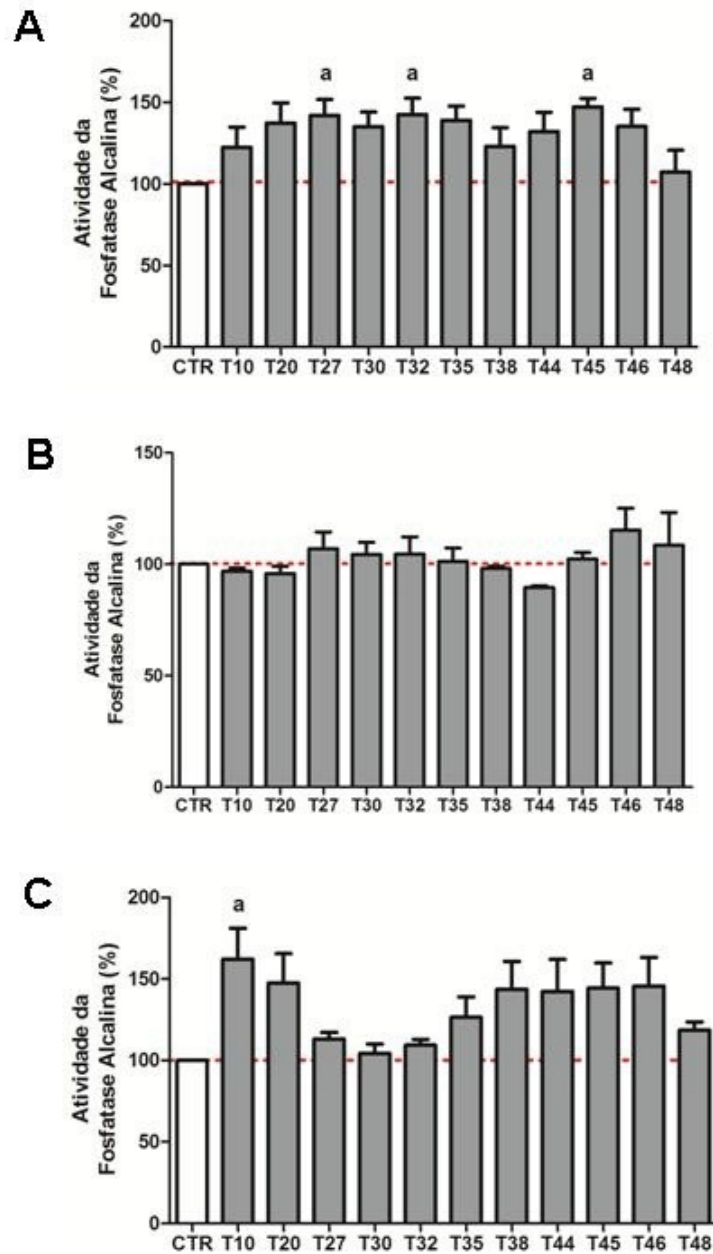


Figura 7. Atividade da ALP em rOB. Atividade da fosfatase alcalina em rOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle (CTR).

Para verificar a atividade da ALP nos rOB frente às amostras, analisou-se qualitativamente a atividade da ALP por microfotografias do precipitado após 14 dias de cultura, foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 8). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras após 14 dias apresentavam

qualitativamente atividade da ALP semelhante aos controles (Figura 8). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

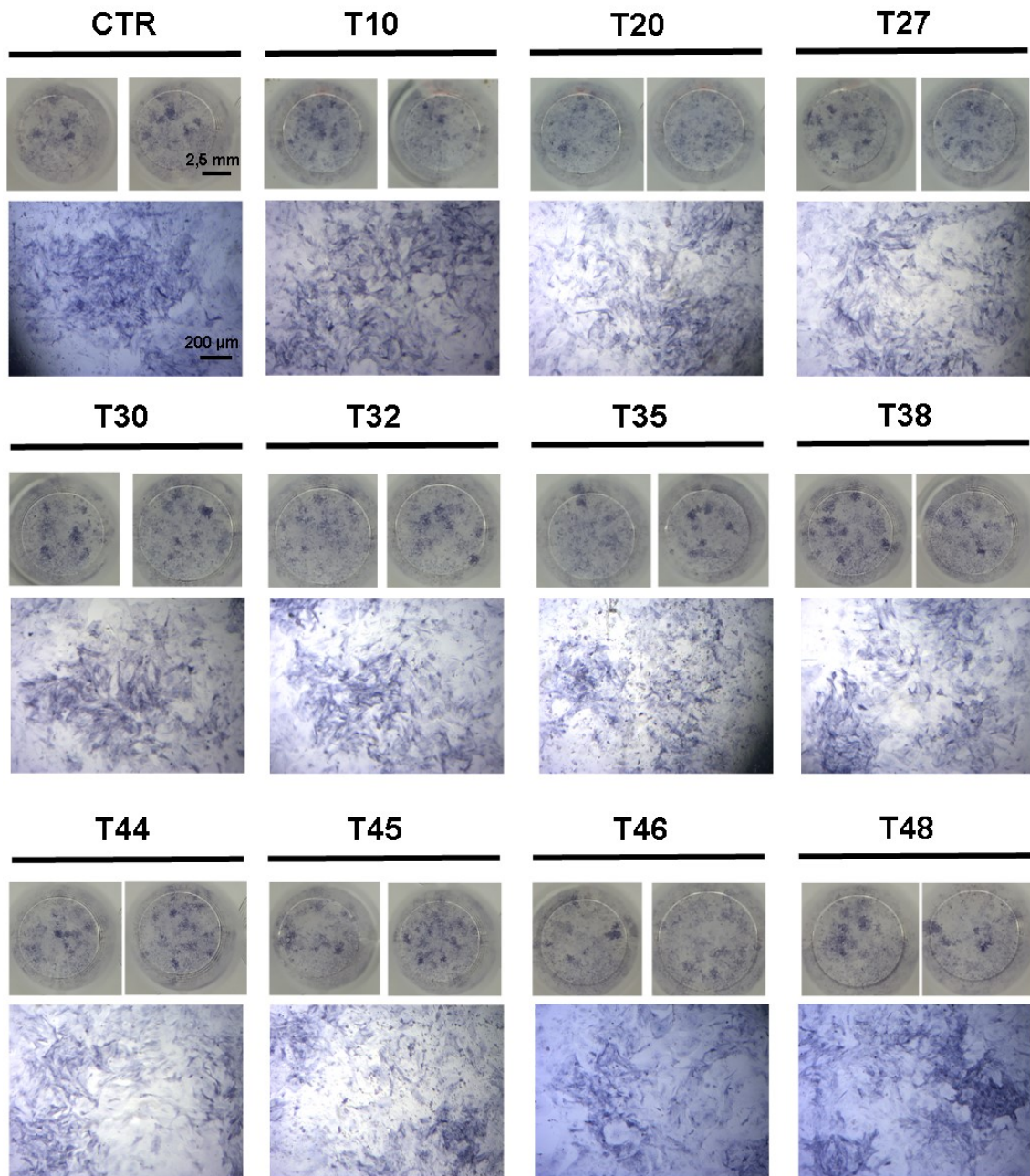


Figura 8. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. A ALP metaboliza o reagente NBT/BCIP produzindo um precipitado roxo. O experimento foi realizado em duplicata. Aumento 100X.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da formação de nódulos de mineralização, as células foram coradas com *Alizarin Red S* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 9). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras T35, T44 e T46 coraram moderadamente

quando comparados aos controles (Figura 9). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

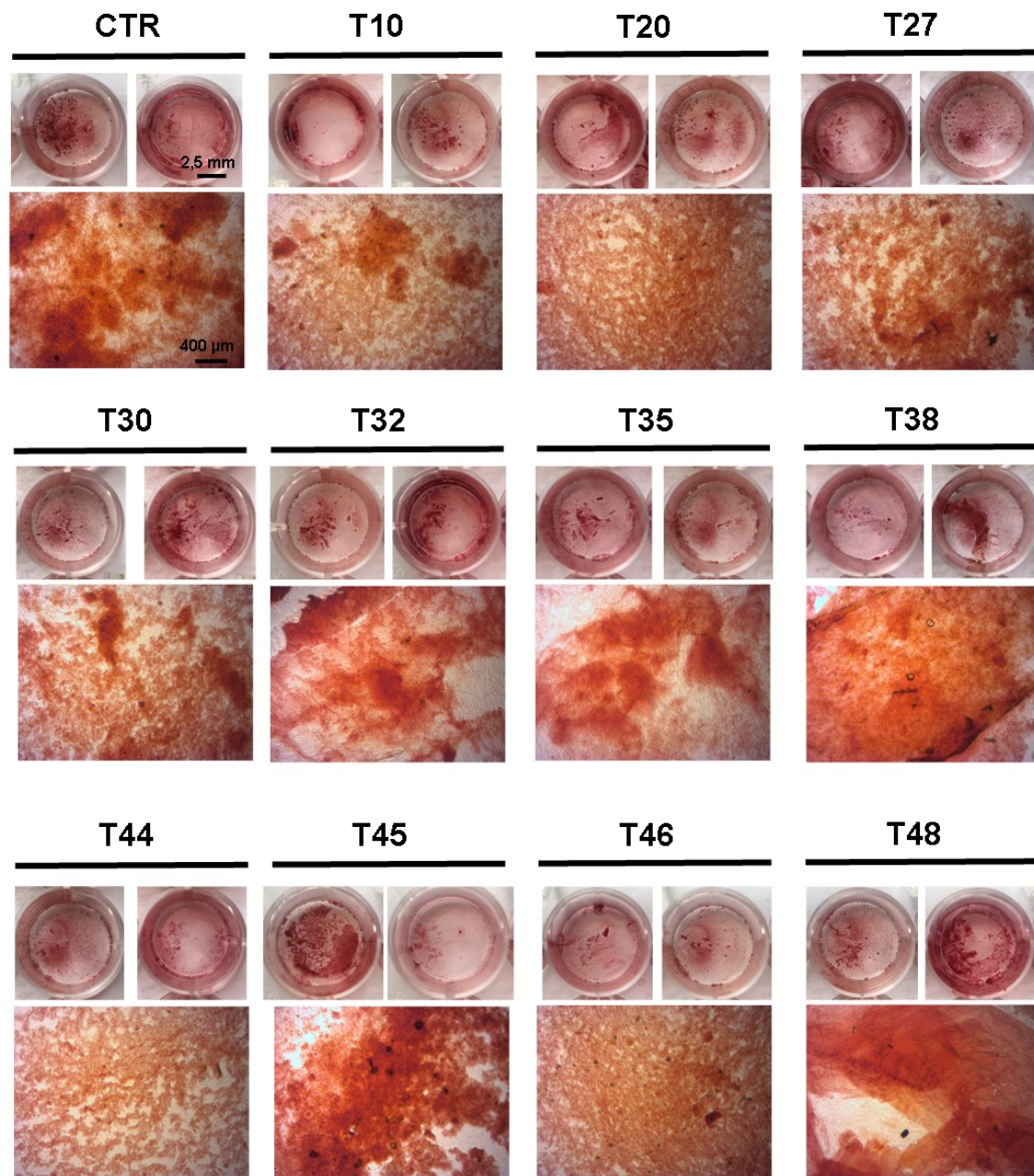


Figura 9. Fotomicrografia da coloração por *Alizarin Red S* em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em vermelho e representam a formação de nódulos de mineralização. Aumento 40X.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da deposição de cálcio, os rOB foram corados pela coloração *Von Kossa* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 10). Foi observado que apenas os osteoblastos expostos aos compostos T46 coraram moderadamente quando comparados aos controles (Figura 10). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

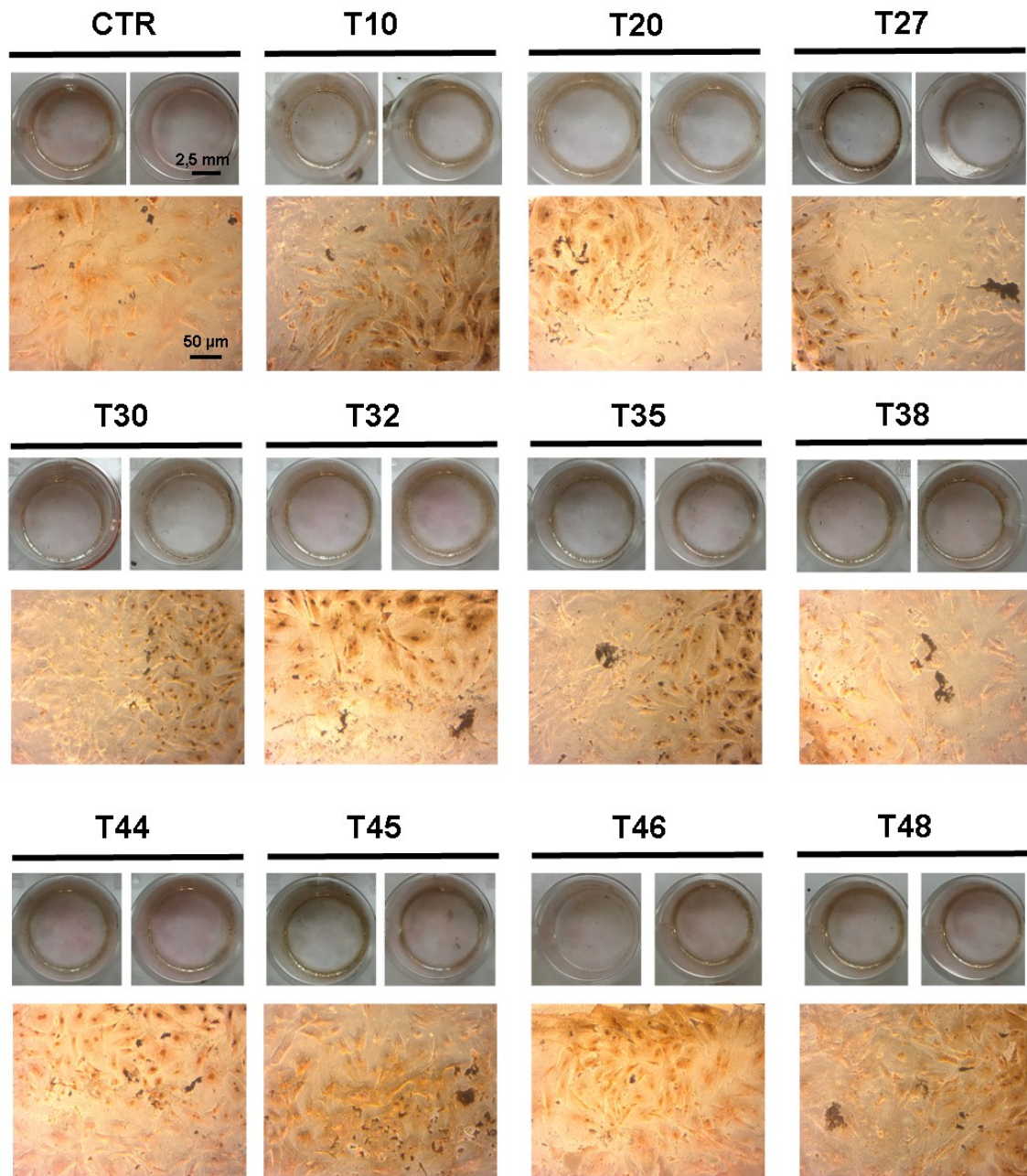


Figura 10. Fotomicrografia da coloração por *Von kossa* em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em preto e é utilizada para quantificar a mineralização na cultura de células. Aumento 200X.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da síntese de matriz orgânica, a produção de colágeno pelos rOB foi quantificada (Figura 11). Após 3 dias, os rOB cultivados com as amostras T27 apresentaram maior produção de colágeno quando comparadas aos controles (Figura 11A). Após 7 dias de cultivo, os rOB cultivados com as amostras T27, T30 e T44 apresentam maior produção de colágeno quando comparadas aos controles (Figura 11B). Em contrapartida, os rOB cultivados com as amostras T32 apresentam menor produção de colágeno quando comparadas aos controles (Figura 11B). Aos 14 dias, os rOB cultivados

com as amostras T20 apresentam maior produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 11C). Esses dados sugerem que os compostos T20, T27, T30, T44 e T45 auxiliam a maturação de rOB.

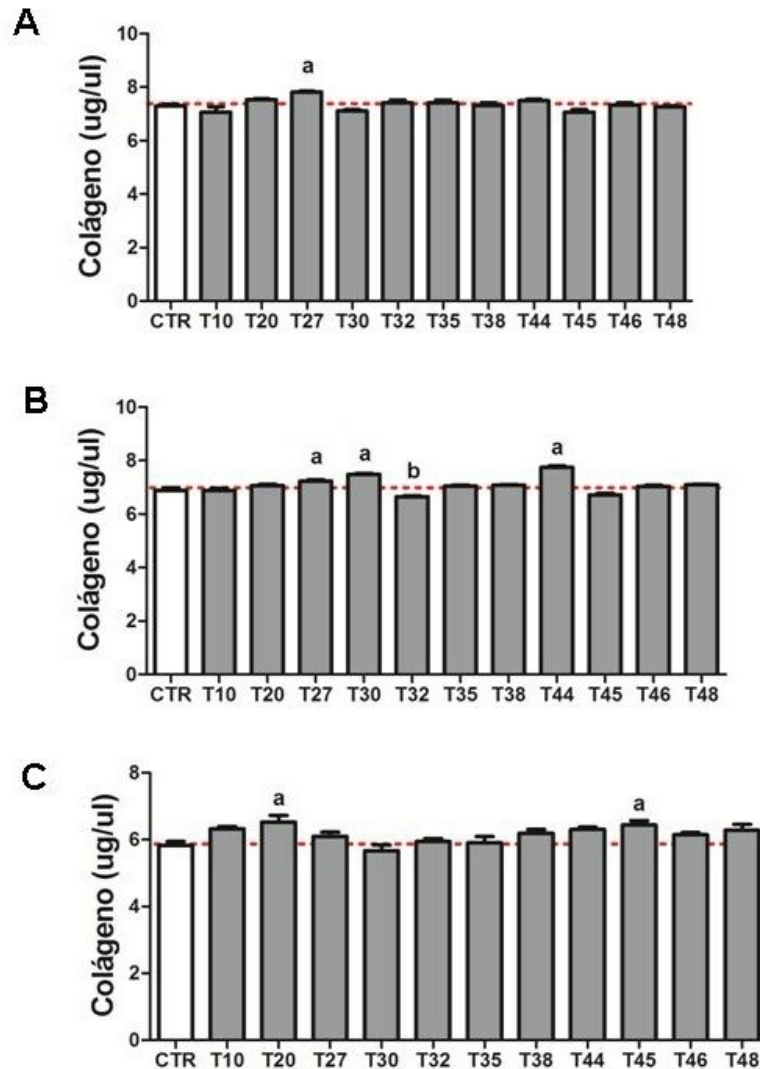


Figura 11. Quantificação de colágeno nos rOB. Quantificação de colágeno produzidos pelos rOB expostos aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que os controles; b: significativamente menor que os controles.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da deposição de matriz orgânica, os rOB foram corados pelo reagente *sirius red* para verificar a produção de colágeno pelos rOB e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 12). Foi observado que as amostras T10, T27, T38 e T46 coraram fracamente quando comparadas aos controles (Figura 12). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

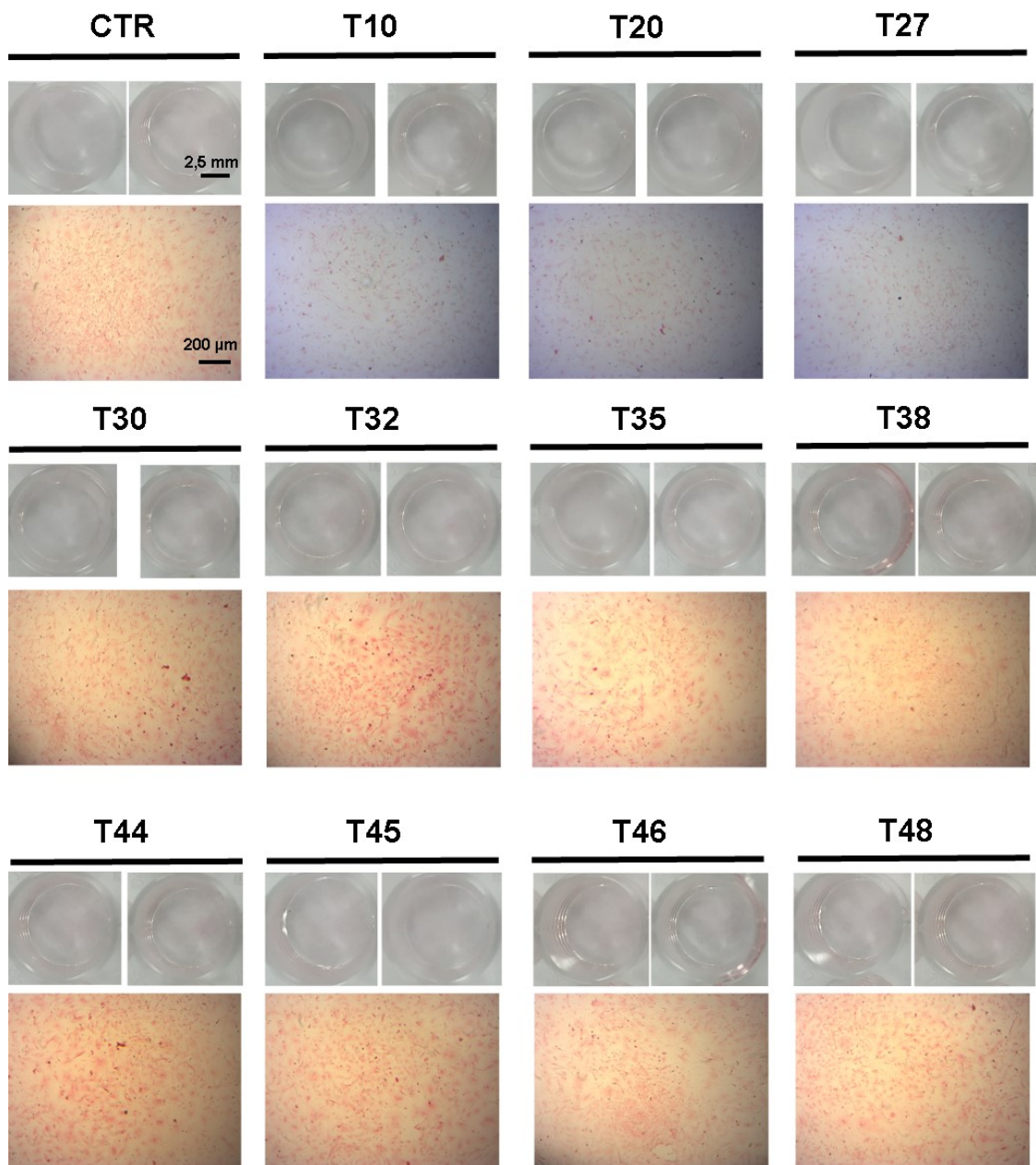


Figura 12. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. O colágeno depositado pelos rOB cora-se em vermelho/rosa. Barra de escala: 200 μ m

As análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação dos rOB foram resumidas na abaixo (Tabela 6).

Tabela 6. Score das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de rOBs.

Amostras	Coloração			
	ALP	<i>Alizarin Red S</i>	<i>Von Kossa</i>	<i>Sírius Red</i>
T10	++++	++++	++++	++
T20	++++	++++	++++	++++
T27	++++	++++	++++	++
T30	++++	++++	++++	++++
T32	++++	++++	++++	++++
T35	++++	+++	++++	++++
T38	++++	++++	++++	++
T44	++++	+++	++++	++++
T45	++++	++++	++++	++++
T46	++++	+++	+++	++
T48	++++	++++	++++	++++
CTR	++++	++++	++++	++++

Após os ensaios de viabilidade e maturação celular, foi decidido excluir as amostras T32 e T44. As amostras em questão apresentaram menor viabilidade celular, aos 14 dias de ensaio, quando comparadas com os controles (Figura 6). Apesar de não apresentarem diferenças significativas nos ensaios de maturação celular, quando comparadas aos controles, as amostras T32 e T44 não foram consideradas moléculas promissoras. Em conjunto, os dados mostraram que os demais compostos foram eficientes em promover a maturação dos rOB e a sua eficiência em promover a osteogênese em hASC foi testada subsequente.

4.3. Potencial osteogênico das moléculas nas células-tronco mesenquimais humanas (hASC)

A fim de avaliar se as amostras podem afetar outros modelos celulares, foram utilizado células-tronco mesenquimais humanas (hASC) visando à seleção dos melhores fármacos para aplicação clínica em humanos. O potencial osteogênico de cada molécula foi avaliado em hASC que foram expostas as moléculas T10, T20, T27, T30, T35, T38, T45, T46

e T48 durante 21 dias. Além da exposição aos compostos, as hASC receberam meio de diferenciação osteogênica enquanto os controles receberam apenas meio basal. Quando analisamos as hASC que receberam meio basal, observamos que as amostras T10, T20, T27, T30, T45, T46 e T48 auxiliaram a viabilidade das hASCs após 7 dias de cultivo (Figura 13A). Após 14 dias, as hASCs que foram expostas as amostras T30, T45 e T48 apresentaram maior viabilidade celular (Figura 13B). Apenas as amostras T20 e T27 auxiliaram a viabilidade das hASC após 21 dias (Figura 13C).

Entre as hASC cultivadas com meio osteogênico, observamos que as amostras T46-D e T48-D auxiliaram a viabilidade das hASCs após 7 dias de cultivo (Figura 12A). Após 14 dias, as hASCs que foram expostas as amostras T30-D, T38-D, T45-D, T46-D e T48-D apresentaram maior viabilidade celular (Figura 12B). Apenas a amostra T48-D auxiliou a viabilidade das hASC após 21 dias enquanto as hASC expostas a amostra T30-D apresentou menor viabilidade após 21 dias (Figura 13C).

Após 7 dias de cultivo, observamos diferenças significativas entre a viabilidade das hASC indiferenciadas (meio basal) e das hASC diferenciadas (meio osteogênico) que receberam as amostras T10, T20, T30 e T45 (Figura 12D). Após 14 dias observamos diferenças significativas entre a viabilidade de todas as amostras (Figura 13E). E após 21 dias, apenas as amostras T48 não apresentaram diferenças significativas na sua viabilidade (Figura 13F).

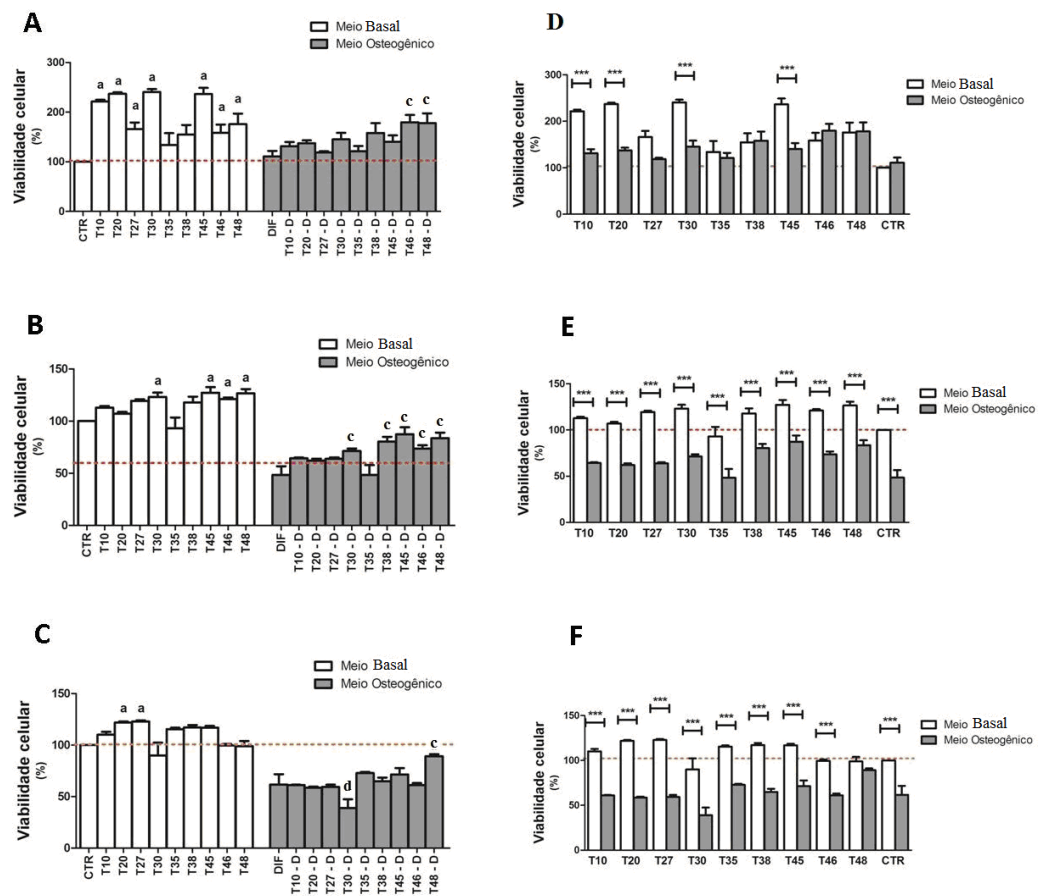


Figura 13. Viabilidade das hASC. Viabilidade das hASC em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias, **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo comparados aos controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Comparação da viabilidade entre as hASCs expostas aos mesmos compostos durante **D.** 7 dias, **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. **a:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio basal. **b:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio basal. **c:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio osteogênico. **d:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio osteogênico.

A fim de evidenciar a diferenciação celular das hASC, a atividade da ALP foi quantificada. As hASC que receberam meio basal apresentaram maior atividade de ALP quando expostas às amostras T10, T20, T27 e T35 após 7 dias de cultivo (Figura 14A). Após 14 dias, as hASC expostas as amostras T10, T38, T45 e T46 apresentaram maior atividade de ALP (Figura 14B). Após 21 dias não observamos diferenças significativas na atividade de ALP (Figura 14C).

Entre as hASC cultivadas com meio osteogênico, observamos uma maior atividade de ALP na amostra T38-D após 7 dias de cultivo (Figura 14A). Após 14 (Figura 14B) e 21 (Figura 14C) dias observamos maior atividade de ALP nas amostras T27-D, T35-D e T38-D.

Aos 14 dias, as amostras T30-D apresentaram menor atividade de ALP, entretanto aos 21 dias a atividade da ALP nestas amostras se encontrava maiores que os controles de meio osteogênico (Figura 14C).

Após 7 dias de cultivo, observamos diferenças significativas entre atividade da ALP das hASC indiferenciadas (meio basal) e as hASC diferenciadas (meio osteogênico) que receberam as amostras T20, T27, T35 e T46 (Figura 14D). Após 14 dias, a exposição a todas as amostras acarretou diferenças significativas na atividade da ALP entre os grupos meio basal e meio osteogênico (Figura 14E). E após 21 dias, apenas os grupos que receberam as amostras T20, T46 e T48 não apresentaram diferenças significativas na atividade da ALP (Figura 14F).

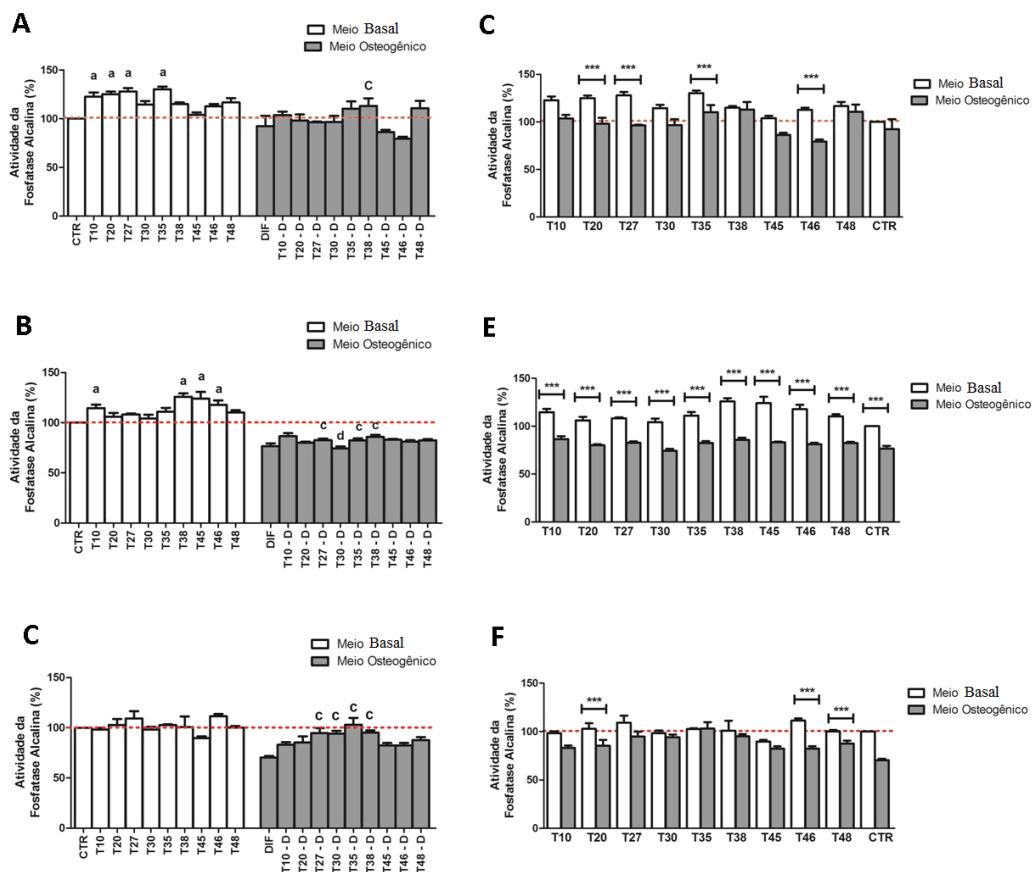


Figura 14. Atividade da ALP em hASC. Atividade da fosfatase alcalina em hASC em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias, **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo comparados aos controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Comparação da atividade da fosfatase alcalina entre as hASC expostas aos mesmos compostos durante **D.** 7 dias, **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. **a:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio basal. **b:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio basal. **c:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio osteogênico. **d:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio osteogênico.

A fim de verificar a diferenciação das hASC, analisou-se qualitativamente a atividade da ALP por fotomicrografias do precipitado após 21 dias de cultura foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 15). Foi observado que os grupos T10, T20, T27, T30, T30-D, T35-D, T38, T38-D, T45, T45-D T46-D e T48-D apresentavam a atividade da ALP qualitativamente elevada (Figura 15). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 7.

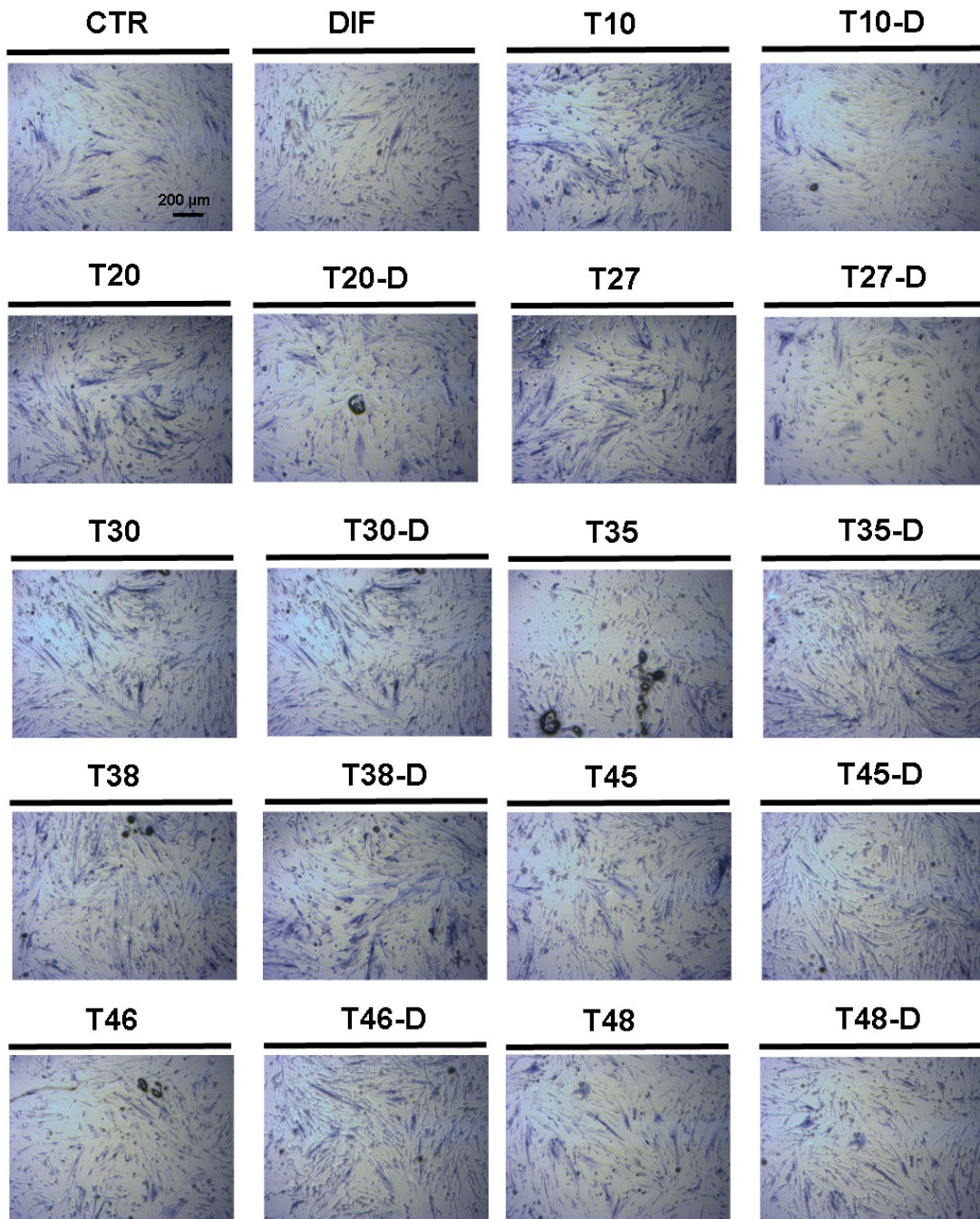


Figura 15. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em hASC expostas aos compostos sintetizados após 21 dias de cultivo. A ALP metaboliza o reagente NBT/BCIP produzindo um precipitado roxo. O experimento foi realizado em duplicata. Aumento 100X.

As hASC foram coradas pela coloração Alizarin red e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 16). Apenas as amostras T46-D e T48-D apresentaram coloração qualitativamente elevada. As hASC indiferenciadas expostas às demais amostras obtiveram coloração qualitativamente fraca. As hASC diferenciadas expostas às demais amostras obtiveram coloração qualitativamente moderada (Figura 16). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 7.

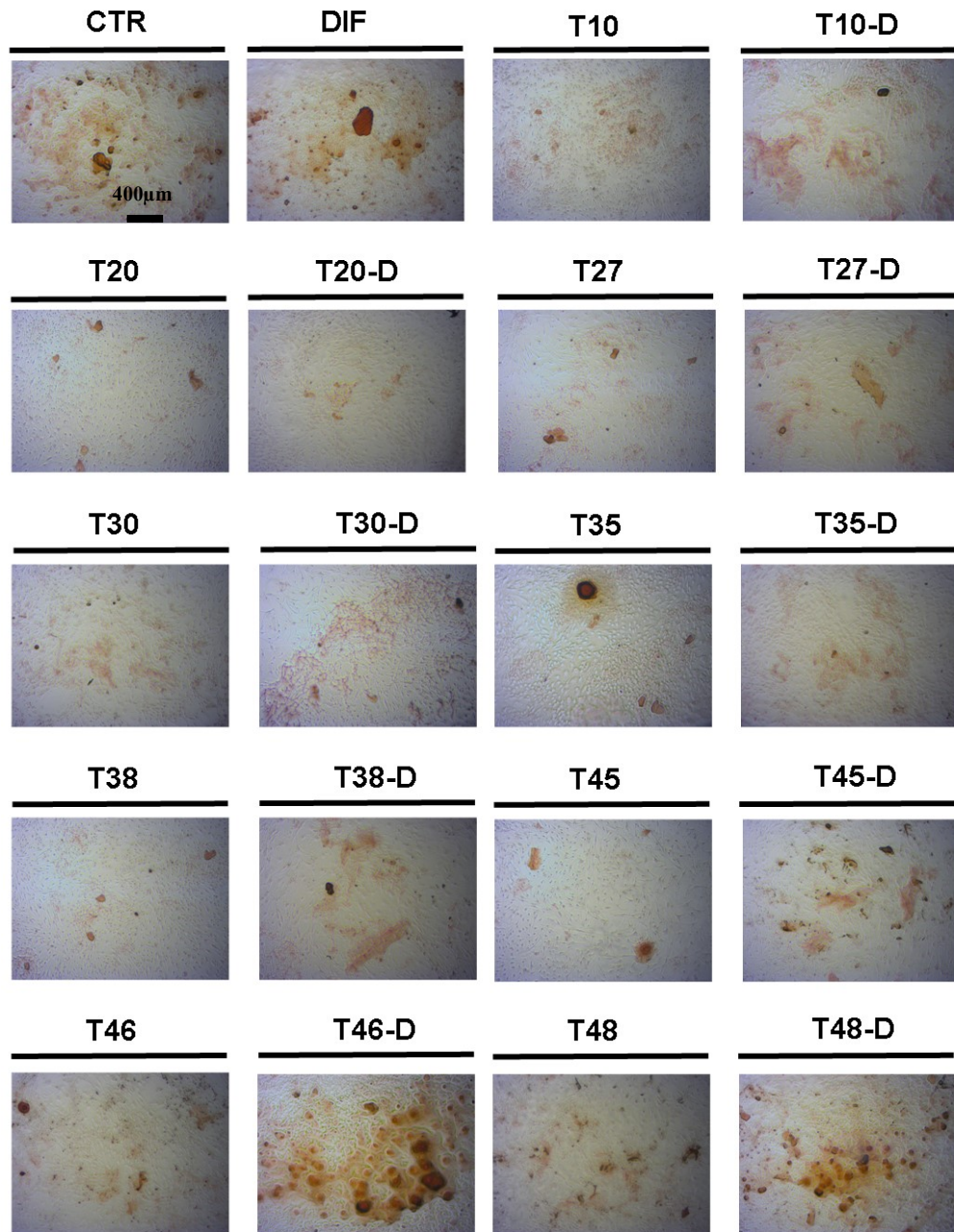


Figura 16. Fotomicrografia da coloração por *Alizarin Red S* em hASC expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em vermelho e representam a formação de nódulos de mineralização. Aumento 40X.

Para verificar a diferenciação das hASC por avaliação da deposição de cálcio, as células foram coradas pela coloração *Von Kossa* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 17). Foi observado que os grupos T10, T20, T27, T30, T38, T45 e T46 apresentaram coloração qualitativamente elevada. Os demais grupos apresentaram coloração qualitativamente semelhante aos controles (Figura 17). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 7.

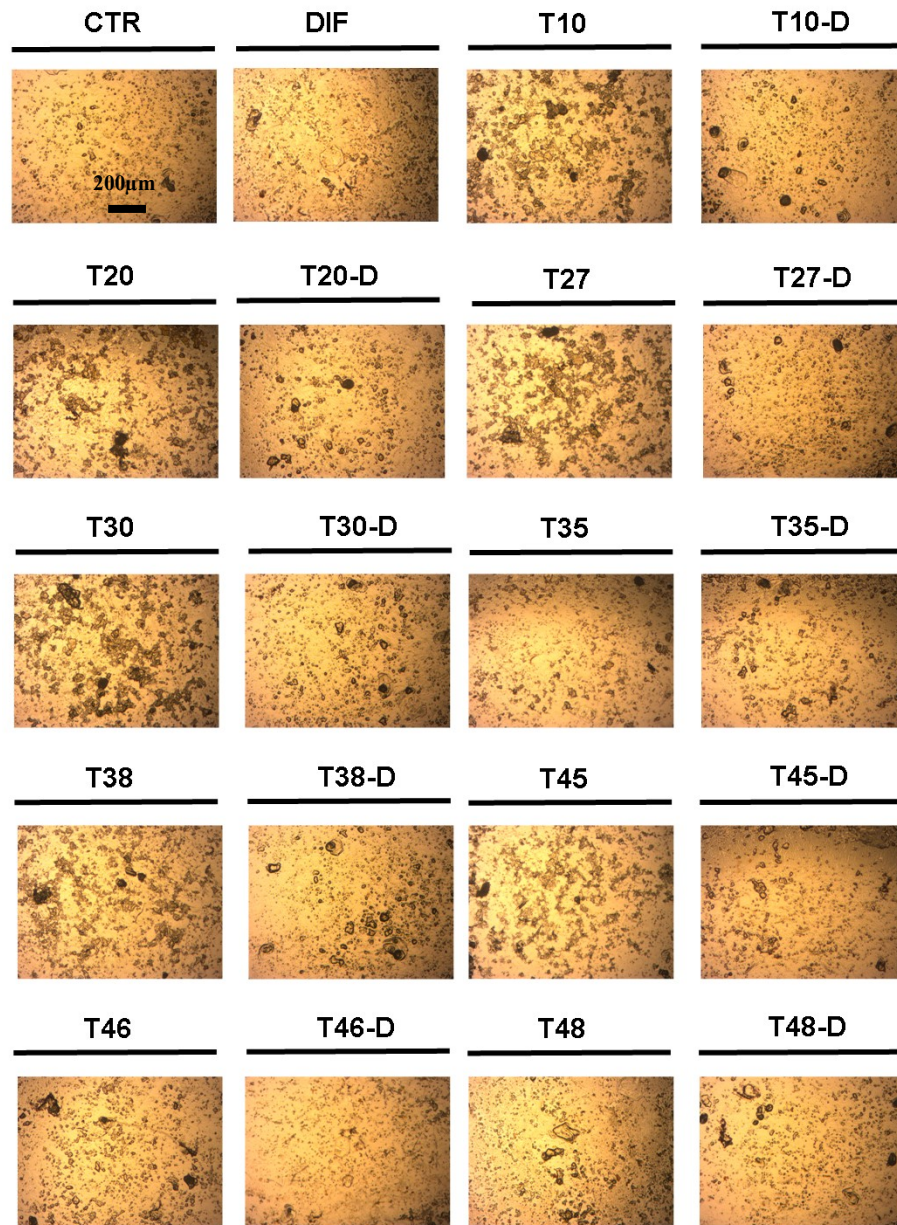


Figura 17. Fotomicrografia da coloração por *Von kossa* em hASC expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em preto e é utilizada para quantificar a mineralização na cultura de células. Aumento 100X.

Para verificar a diferenciação celular das hASC, a síntese de colágeno no meio de cultura foi avaliada. Após 7 dias de cultivo (Figura 18A), as amostras T20, T27, T30 e T48

apresentaram menor concentração de colágeno quando comparadas aos controles basal. As amostras T27-D, T30-D, T45-D, T46-D e T48-D apresentam maior concentração de colágeno enquanto a amostra T38-D apresentou menor concentração de colágeno quando comparadas ao controle de meio osteogênico (Figura 18A).

Após 14 dias de cultivo (Figura 18B), a amostra T27 apresentou menor produção de colágeno quando comparadas ao controle basal. Em contrapartida, as amostras T10-D, T20-D, T27-D, T30-D e T46-D apresentam maior concentração de colágeno quando comparadas ao controle de meio osteogênico (Figura 18B).

Após 21 dias de cultivo (Figura 18C), observamos uma maior concentração de colágeno nas amostras T20, T27, T30, T35, T45, T46 e T48 enquanto a amostra T38 apresentou menor concentração de colágeno quando comparadas ao controle basal. Por sua vez, as amostras T38-D, T45-D e T48-D apresentam maior concentração de colágeno quando comparadas ao controle de meio osteogênico (Figura 18C).

Após 7 dias de cultivo, observamos diferenças significativas na síntese de colágeno das hASC indiferenciadas (meio basal) e as hASC diferenciadas (meio osteogênico) expostas a todas as amostras, exceto a amostra T10 (Figura 18D). Após 14 dias observamos diferenças significativas na síntese de colágeno entre os grupos que receberam apenas a amostra T27 (Figura 18E). E após 21 dias, observamos diferenças significativas na síntese de colágeno entre os grupos celulares de todas as amostras (Figura 18F).

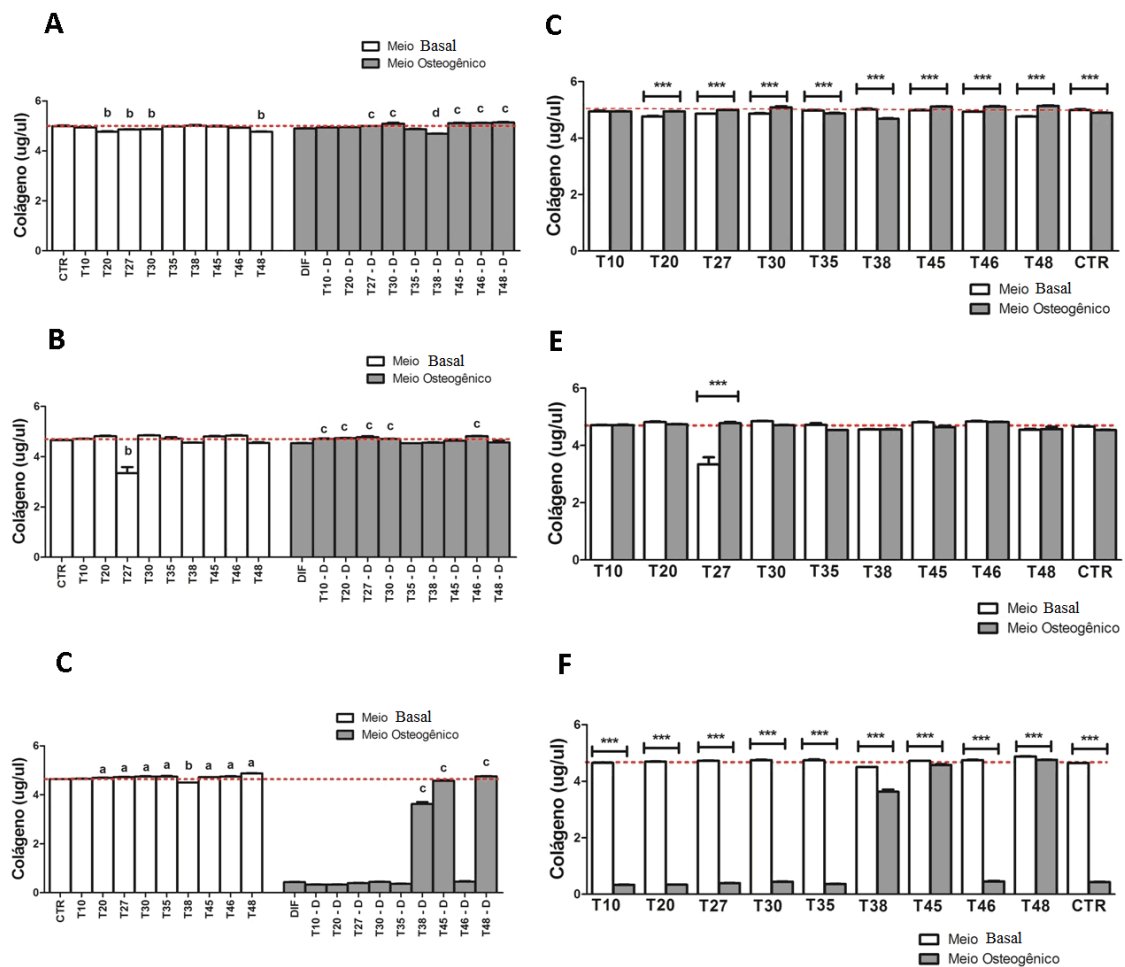


Figura 18. Quantificação de colágeno em hASC. Quantificação de colágeno em hASC em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 7 dias, **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo comparados aos controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Comparação da produção de colágeno pelas hASC expostas aos mesmos compostos durante **D.** 7 dias, **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. **a:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio basal. **b:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio basal. **c:** significativamente maior comparado aos controles que receberam meio osteogênico. **d:** significativamente menor comparado aos controles que receberam meio osteogênico.

Após 21 dias, as hASC foram coradas pelo reagente *Sirius Red* para verificar a produção de colágeno por essas células e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 19). Não foi observada coloração positiva nas células indiferenciadas. Em contrapartida, as hASC que receberam meio osteogênico coraram-se levemente pelo reagente (Figura 19).

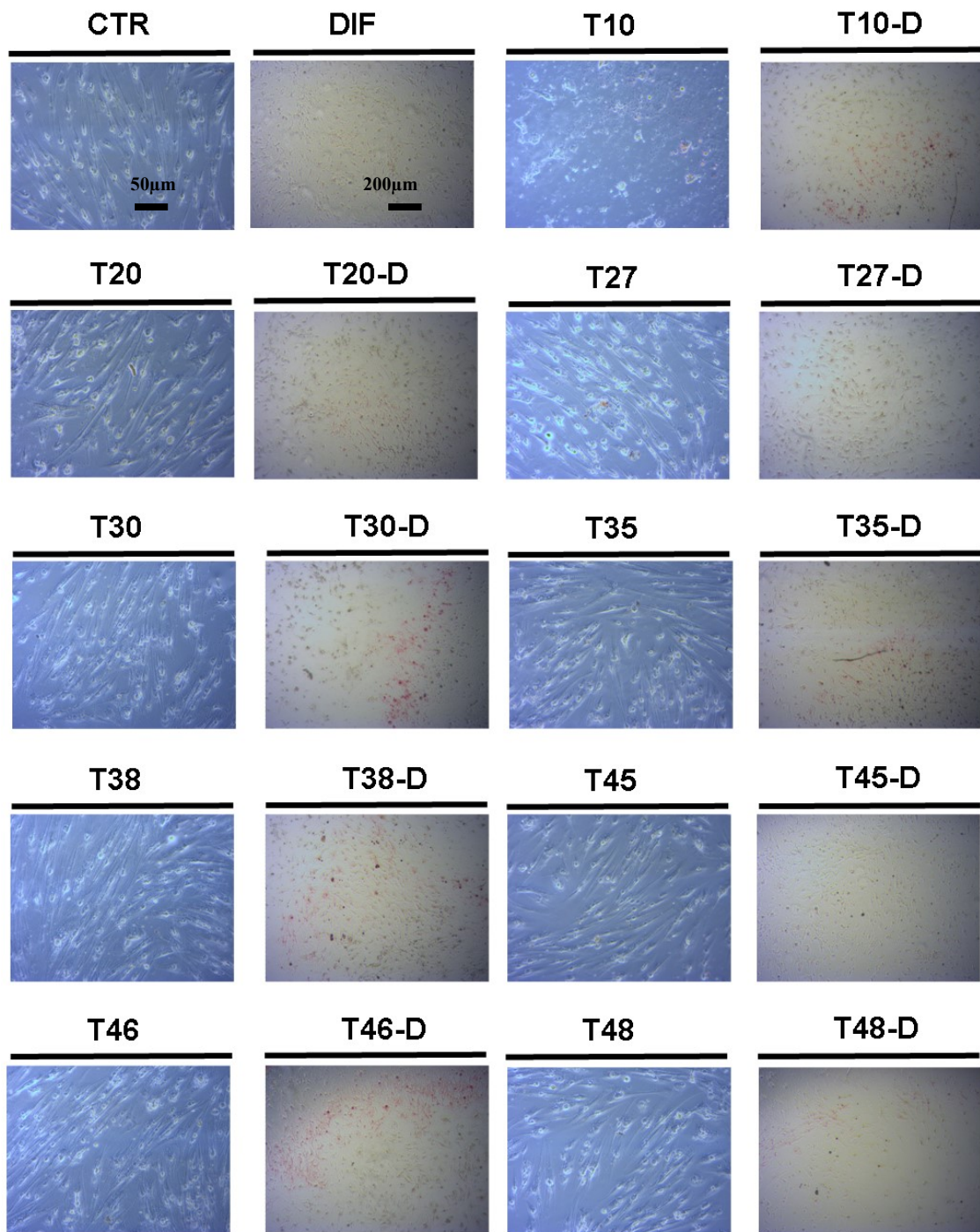


Figura 19. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. O colágeno depositado pelos rOB cora-se em vermelho/rosa. Aumento: hASC indiferenciadas 200x, hASC diferenciadas: 100x.

As análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação dos rOB foram resumidas na abaixo (Tabela 7).

Tabela 7. Score das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a diferenciação de hASCs.

Amostras	Coloração			
	ALP	<i>Alizarin Red S</i>	<i>Von Kossa</i>	<i>Sírius Red</i>
T10	++++	++	++++	-
T10 - D	+++	+++	+++	+
T20	++++	++	++++	-
T20 - D	+++	++	+++	+
T27	++++	++	++++	-
T27 - D	+++	++	+++	+
T30	++++	++	++++	-
T30 - D	++++	+++	+++	+
T35	+++	++	+++	-
T35 - D	++++	+++	+++	+
T38	++++	++	++++	-
T38 - D	++++	+++	+++	+
T45	++++	++	++++	-
T45 - D	++++	+++	+++	+
T46	+++	++	++++	-
T46 - D	++++	++++	+++	+
T48	+++	++	+++	-
T48 - D	++++	++++	+++	+
CTR	+++	++++	+++	-
DIF	+++	++++	+++	+

Após os ensaios de viabilidade e diferenciação celular nas hASC, foi decidido excluir a amostra T48. A amostra não beneficiou a diferenciação das hASC quando comparadas com os controles (Figura 13) e, desta forma, não foi considerada uma molécula promissora. Em conjunto, os dados mostraram que os demais compostos foram eficientes em promover a

diferenciação celular das hASC, com destaque para as moléculas T10, T27, T30, T35, T38, T45 e T46.

Os próximos passos deste trabalho foram avaliar o potencial anti-osteoclastogênico dos compostos. Os experimentos *in vitro* foram realizados com células de camundongos C57/bl6. Esse modelo foi escolhido por serem animais isogênicos, é um modelo amplamente utilizado em ensaios imunológicos e de toxicologia, além do fato de nosso grupo de pesquisa possuir uma colônia deste modelo animal. Entretanto, como seria utilizado outro modelo celular para avaliar o potencial anti-osteoclastogênico dos compostos, era de extrema importância avaliar o efeito desses compostos nos osteoblastos extraídos da calvária de camundongos C57/bl6 (mOB). Portanto, em seguida, nós avaliamos a viabilidade e maturação celular dos mOB.

4.4. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB)

Após 3 dias de cultivo, observamos uma maior viabilidade celular dos osteoblastos cultivados com a amostra T10 quando comparados aos controles (Figura 20A). Em 7 dias de cultivo, observamos uma maior viabilidade celular dos osteoblastos cultivados com a amostra T38 quando comparados aos controles (Figura 20B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com a amostra T20 apresentaram menor viabilidade celular quando comparados aos controles, enquanto os osteoblastos cultivados com a amostra T46 apresentaram maior viabilidade celular quando comparados aos controles (Figura 20C).

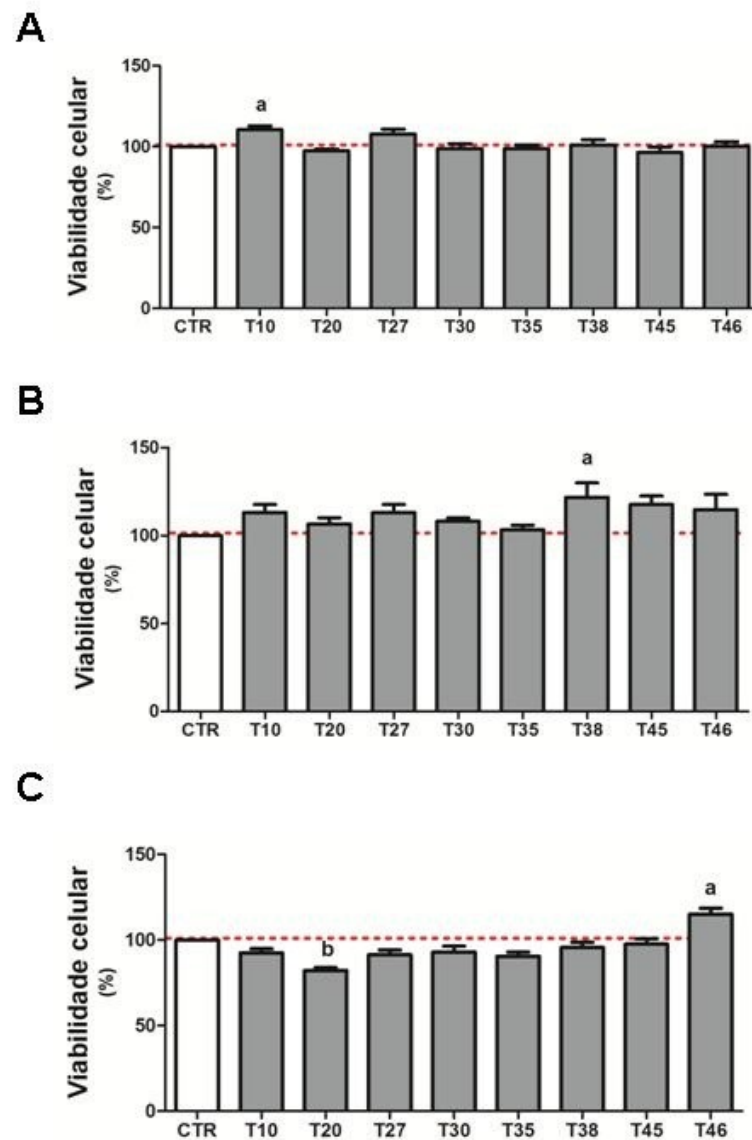


Figura 20. Viabilidade dos mOB. Viabilidade dos mOB expostos aos compostos durante **A.** 3 dias **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior quando comparadas ao CTR. b: significativamente menor quando comparado ao CTR.

Após 3 dias de cultivo, não observamos diferenças significativas na atividade da ALP nos osteoblastos cultivados com os compostos quando comparados aos controles (Figura 21A). Em 7 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos T30, T38 e T46 apresentaram maior atividade da ALP quando comparados aos controles (Figura 21B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com a amostra T20, T27, T30, T35, T38 e T45 apresentaram menor atividade da ALP quando comparados aos controles (Figura 21C). Estes dados sugerem que, em longos períodos, os compostos T20 são citotóxicos para os mOB e os compostos T27, T30, T35, T38 e T45 auxiliam a maturação dos mOB.

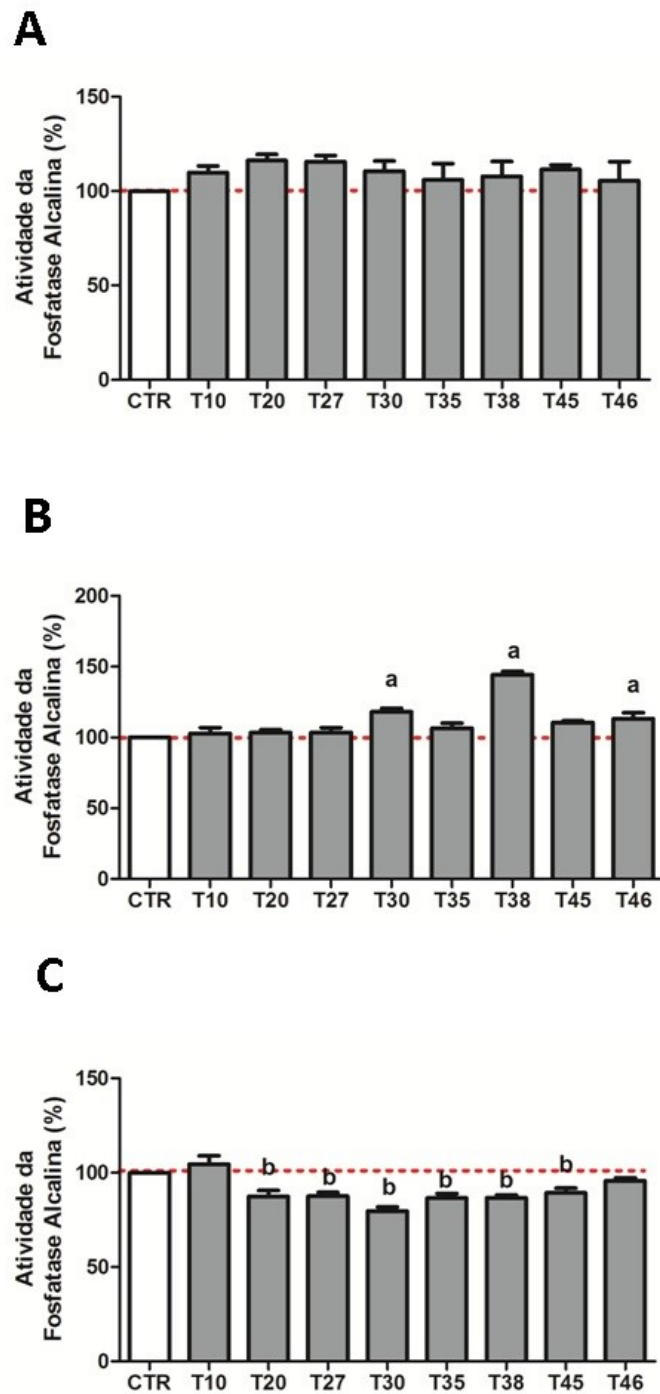


Figura 21. Atividade da ALP nos mOB. Atividade da fosfatase alcalina em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que os controles. b: significativamente menor que os controles.

Para verificar a maturação dos mOB por avaliação da formação de nódulos de mineralização, as células foram coradas com *Alizarin Red S* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 22). Foi observado

que todos os osteoblastos expostos às amostras coraram-se qualitativamente moderado (Figura 22). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 8.

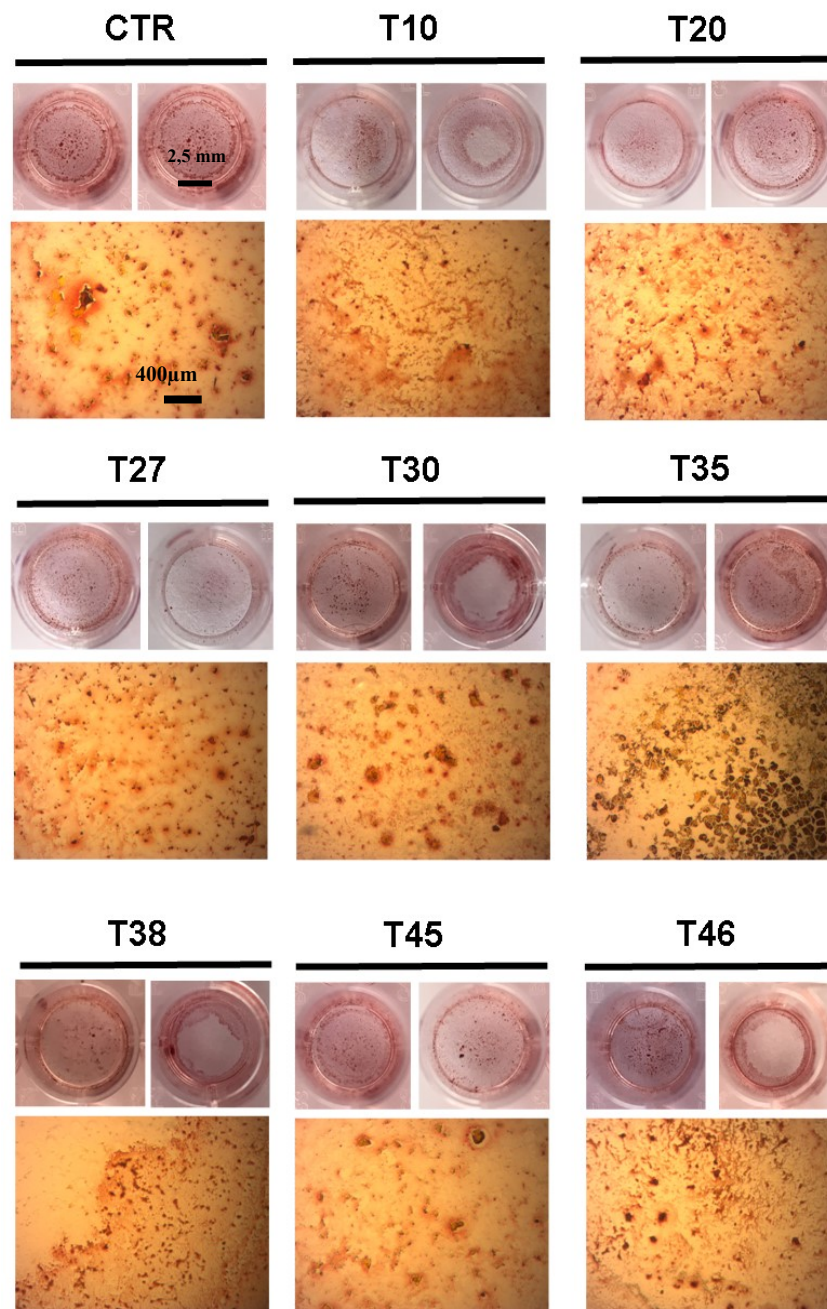


Figura 22. Fotomicrografia da coloração por Alizarin Red em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em vermelho e representam a formação de nódulos de mineralização. Aumento 40X.

Para avaliar a maturação dos mOB por avaliação da deposição de cálcio, os mOB foram corados pela coloração *Von Kossa* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 23). Foi observado que os osteoblastos expostos às amostras T27, T35, T38 e T45 obtiveram coloração qualitativamente

moderada, enquanto os demais apresentaram coloração elevada (Figura 23). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 8.

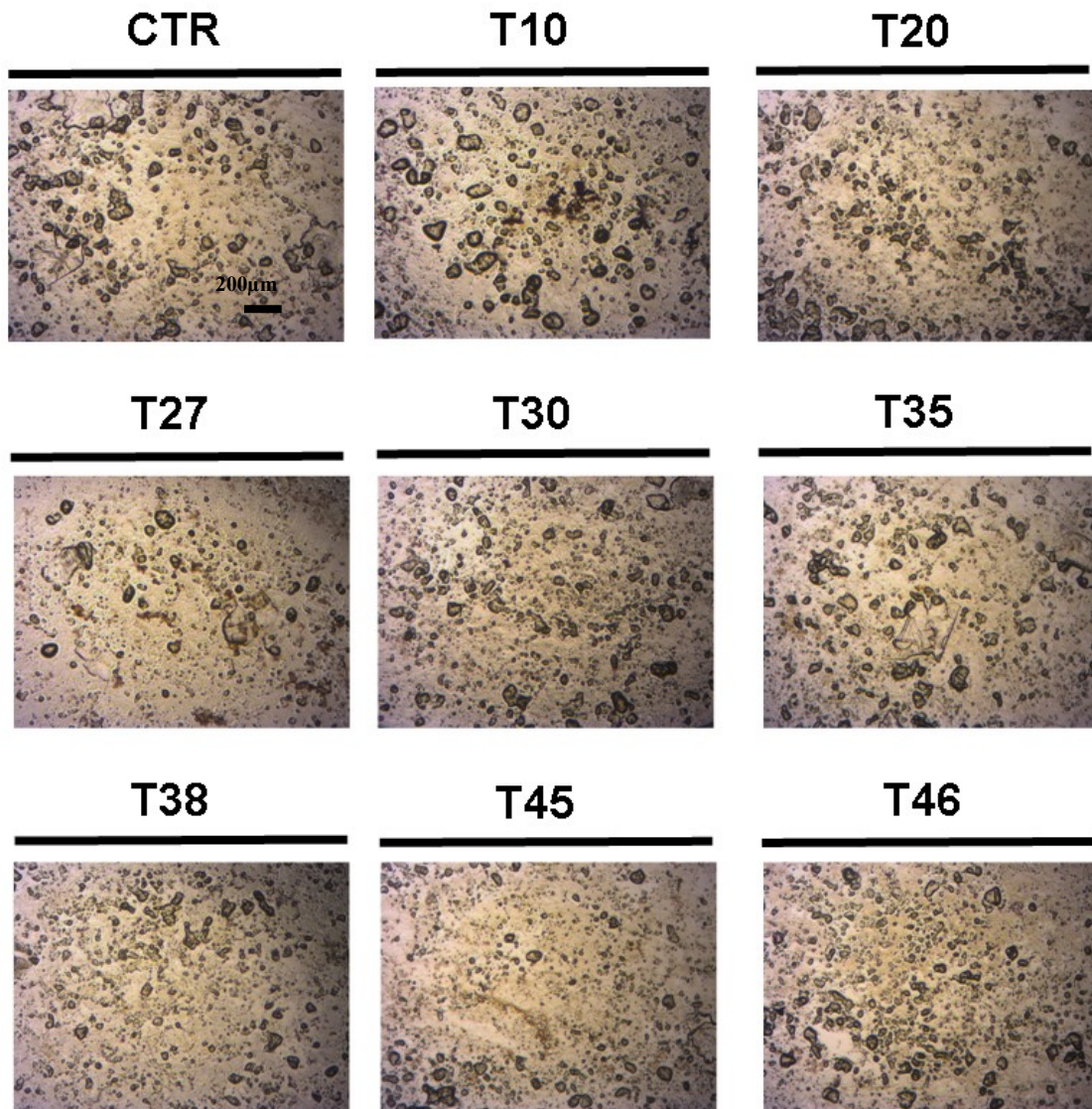


Figura 23. Fotomicrografia da coloração por *Von kossa* em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em preto e esta coloração é utilizada para quantificar a mineralização na cultura de células. Aumento 100X.

Para verificar a maturação dos mOBs por avaliação da deposição de matriz orgânica, os mOB foram corados com *sírius red* para visualizar a produção de colágeno e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 24). Foi observado que os osteoblastos expostos às amostras T10, T27, T30, T45, T46 obtiveram coloração qualitativamente moderada, enquanto as demais a coloração foi qualitativamente elevada (Figura 24). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 8.

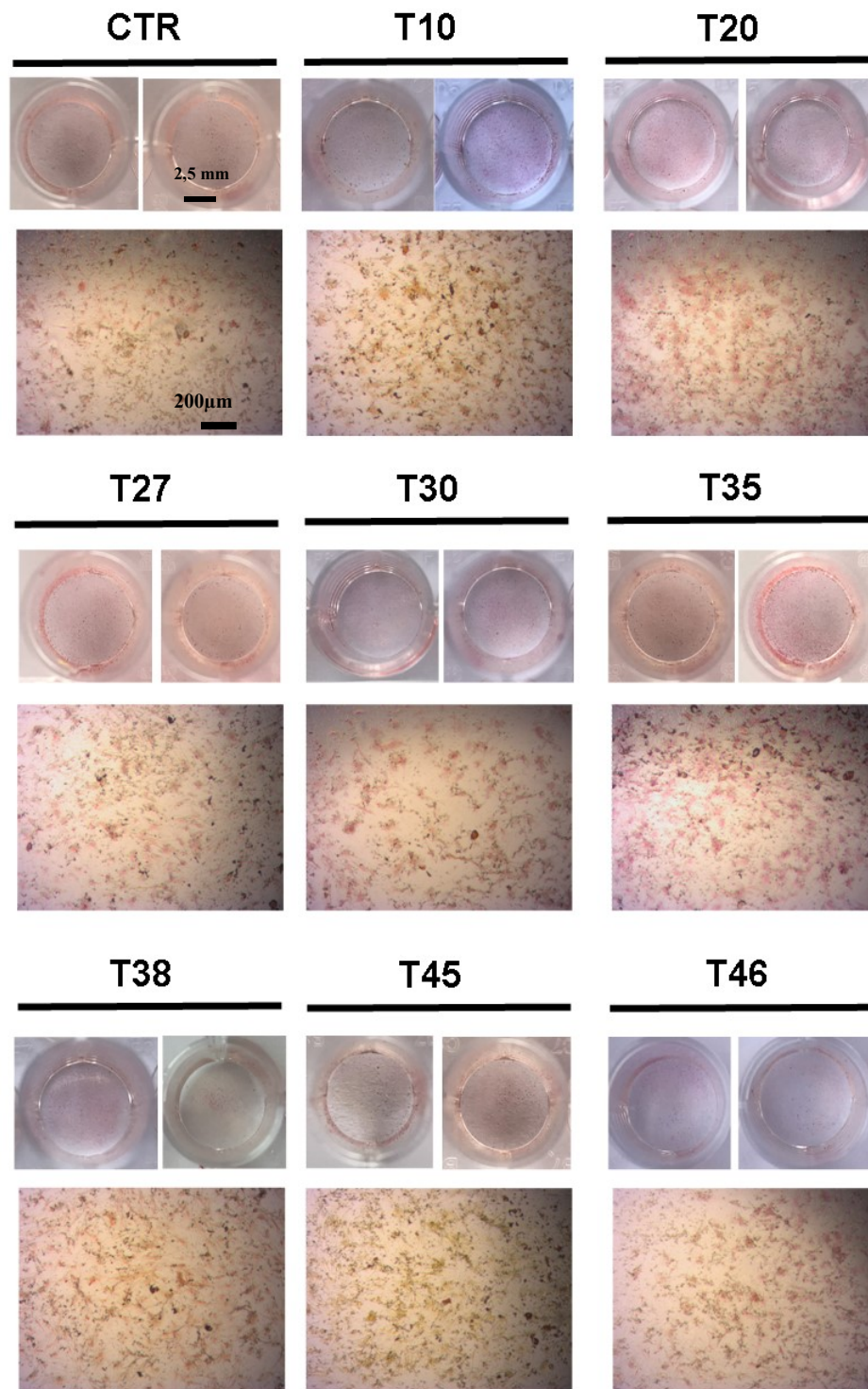


Figura 24. Fotomicrografia da deposição de colágeno em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias. O colágeno depositado pelos mOB cora-se em vermelho/rosa. Aumento: 100x.

Para verificar a maturação dos mOBs por avaliação da síntese de matriz orgânica, a produção de colágeno por essas células foi quantificada (Figura 25). Após 3 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos T20 e T27 apresentaram maior produção de

colágeno quando comparados aos controles (Figura 25A). Em 7 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos T20, T27, T30, T35, T45 e T46 apresentaram maior produção de colágeno comparados aos controles (Figura 25B). Os osteoblastos cultivados com o composto T10 apresentaram menor produção de colágeno quando comparados ao grupo controle (Figura 25B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com os compostos T20, T30 e T45 apresentaram maior produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 25C). Os osteoblastos cultivados com os compostos T27, T35 e T46 apresentaram menor produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 25C).

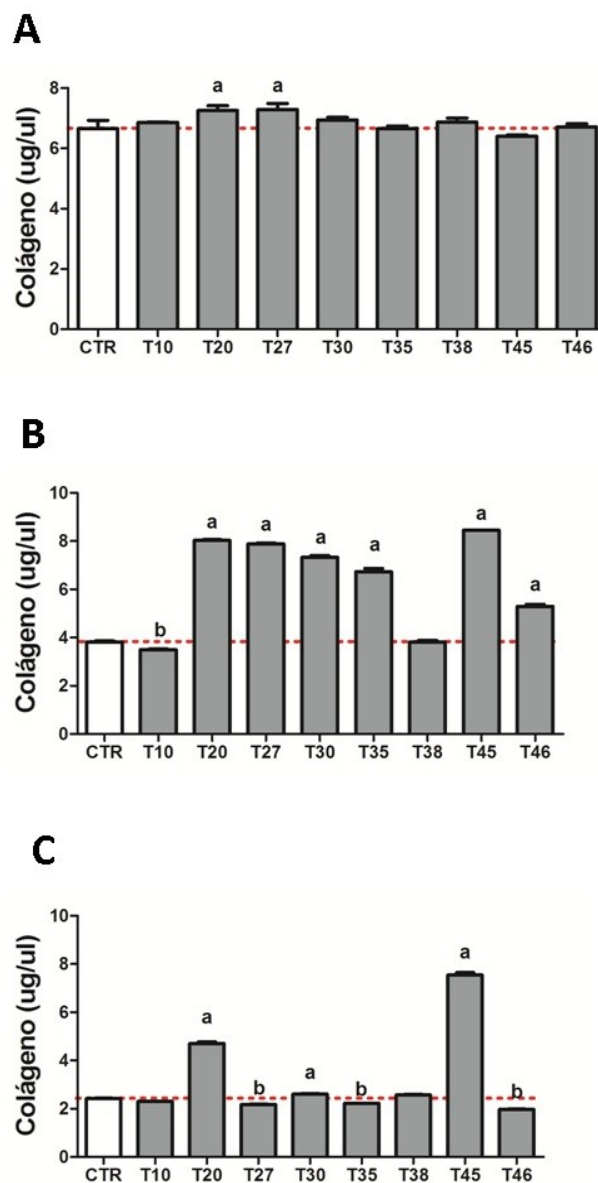


Figura 25. Produção de colágeno em mOB. Produção de colágeno em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle; b: significativamente menor que o controle.

As análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação dos mOB foram resumidas na tabela abaixo (Tabela 8).

Tabela 8. Score das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a diferenciação de mOB.

Amostras	Coloração		
	<i>Alizarin Red S</i>	<i>Von Kossa</i>	<i>Sírius Red</i>
T10	+++	++++	+++
T20	+++	++++	++++
T27	+++	+++	+++
T30	+++	++++	+++
T35	+++	+++	++++
T38	+++	+++	++++
T45	+++	+++	+++
T46	+++	++++	+++
CTR	+++	++++	++++

Após os ensaios de viabilidade e maturação celular nos mOB, foi decidido excluir a amostra T20. O uso crônico desta molécula interferiu de forma negativa na viabilidade dos mOB e além de não beneficiar a atividade da fosfatase alcalina e acelerar a maturação dos osteoblastos quando comparados com os controles (Figura 20) e, desta forma, não foi considerada uma molécula promissora. Em conjunto, os dados mostraram que os demais compostos foram eficientes. Em seguida avaliamos a influência das moléculas selecionadas (T10, T27, T30, T35, T38, T45 e T46) durante a diferenciação de precursores de osteoclastos extraídos da medula óssea de camundongos C57bl/6.

4.5. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas nos precursores de osteoclastos de camundongos C57bl/6

Após a seleção das moléculas com as células rOB, hASC e mOB, foi avaliado o potencial osteoclastogênico dessas moléculas durante a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Primeiramente, os osteoclastos foram extraídos da medula óssea, de acordo com Marino et. al (18) (Figura 5). Os precursores de osteoclastos foram cultivados com 25 ng/ml de m-CSF até atingirem a confluência de 95%.

Após a expansão dos precursores de osteoclastos, as células foram expostas em dois grupos: A) exposição das células a 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e os compostos na concentração pré-estabelecida ou B) exposição das células a 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL, 10ng/ml de OPG e os compostos na concentração pré-estabelecida; sendo ambos grupos mantidos por 7 dias em cultura e a viabilidade e diferenciação avaliadas no 7º dia de cultura. Os grupos controles (CTR) receberam apenas meio basal suplementado acrescido de 25 ng/ml de m-CSF e 10 ng/ml de RANKL enquanto os controles OPG (CTR-OPG) receberam meio basal suplementado acrescido de 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e 10ng/ml de OPG (Figura 26A).

A fim de verificar o sucesso da diferenciação osteoclastogênica, as fotomicrografias por microscopia de contraste de fase foram capturadas pelo microscópio Evos FL (Life Technologies) e os osteoclastos foram contra corados com DAPI para visualização dos núcleos como mostra a Figura 26A. Podemos observar nos controles (CTR) a presença de células grandes e multinucleadas (três núcleos ou mais) com diversas ramificações (setas pretas). Em contrapartida, os precursores que receberam a OPG apresentam células alongadas e menos de três núcleos por célula (Figura 26A). Ainda para verificar a eficiência da diferenciação osteoclastogênica, as células foram coradas por TRAP. Os osteoclastos foram corados em marsala destacado pela seta preta (Figura 26B). Concomitantemente, as células foram expostas ao substrato da fosfatase para verificar a atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). O resultado final é um produto solúvel de coloração amarela e pode ser lido espectrofotometricamente a 405 nm (Figura 26B).

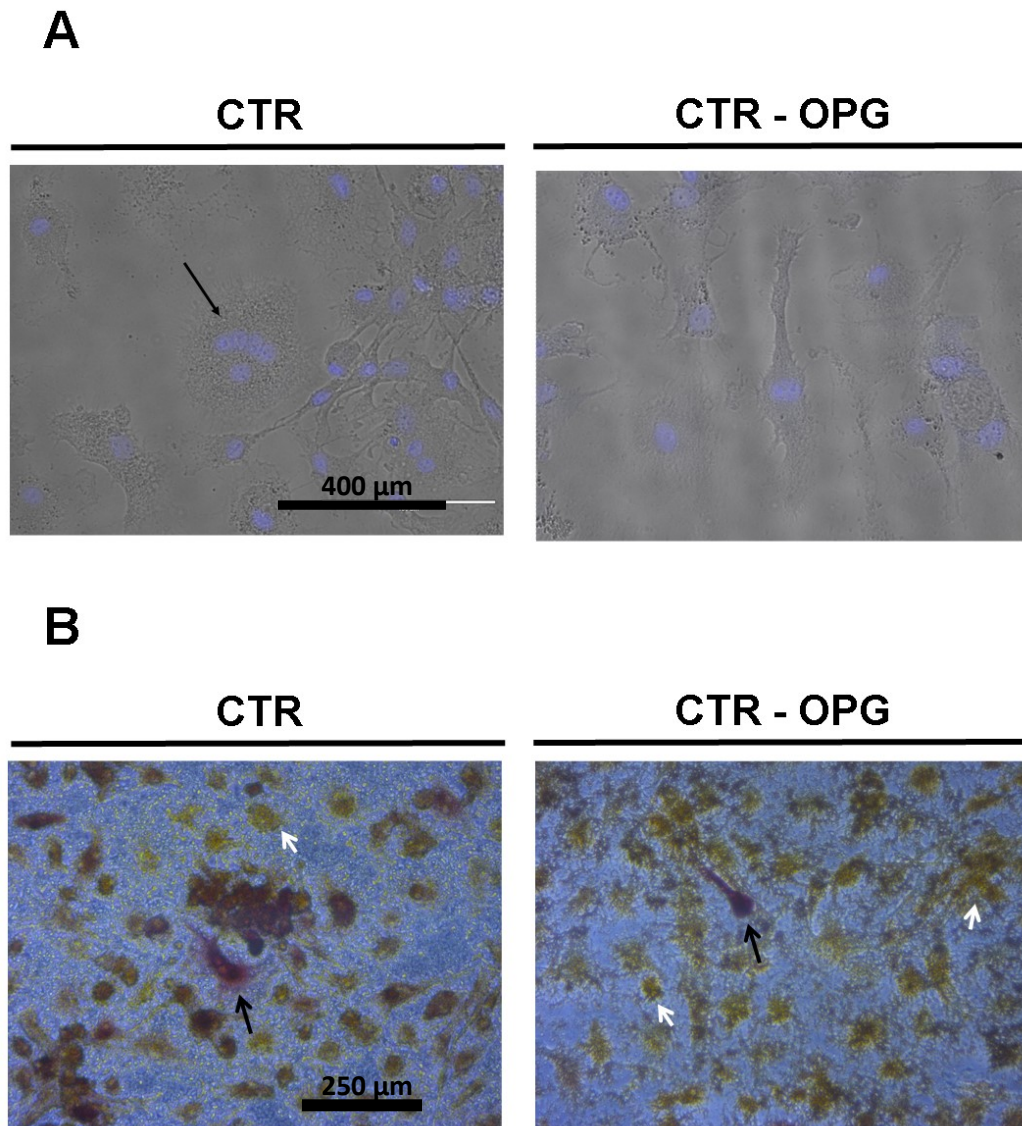


Figura 26. Cultura de osteoclastos. **A.** Imagens dos osteoclastos em microscopia de contraste de fase contracolorados com DAPI. Barra de escala: 100µm. **B.** Coloração por TRAP (em marsala destacado pela seta preta) e coloração da atividade da fosfatase (em amarelo destacado pela seta branca). Aumento de 100x.

A fim de verificar a toxicidade dos compostos durante a diferenciação das HSCs em osteoclastos, após 7 dias a viabilidade das células foi quantificada (Figura 27). Quando comparadas às amostras CTR (m-csf+RANKL), os osteoclastos expostos às amostras T27 e T30 apresentaram maior viabilidade celular. Quando comparadas ao CTR-OPG (m-csf+RANK-L) apenas a amostra T30 apresentou viabilidade celular significativamente maior (figura 27A). Ao expor as culturas às amostras foi possível verificar que as amostras T10-OPG apresentaram maior viabilidade celular quando comparadas às amostras T10 (figura 27B).

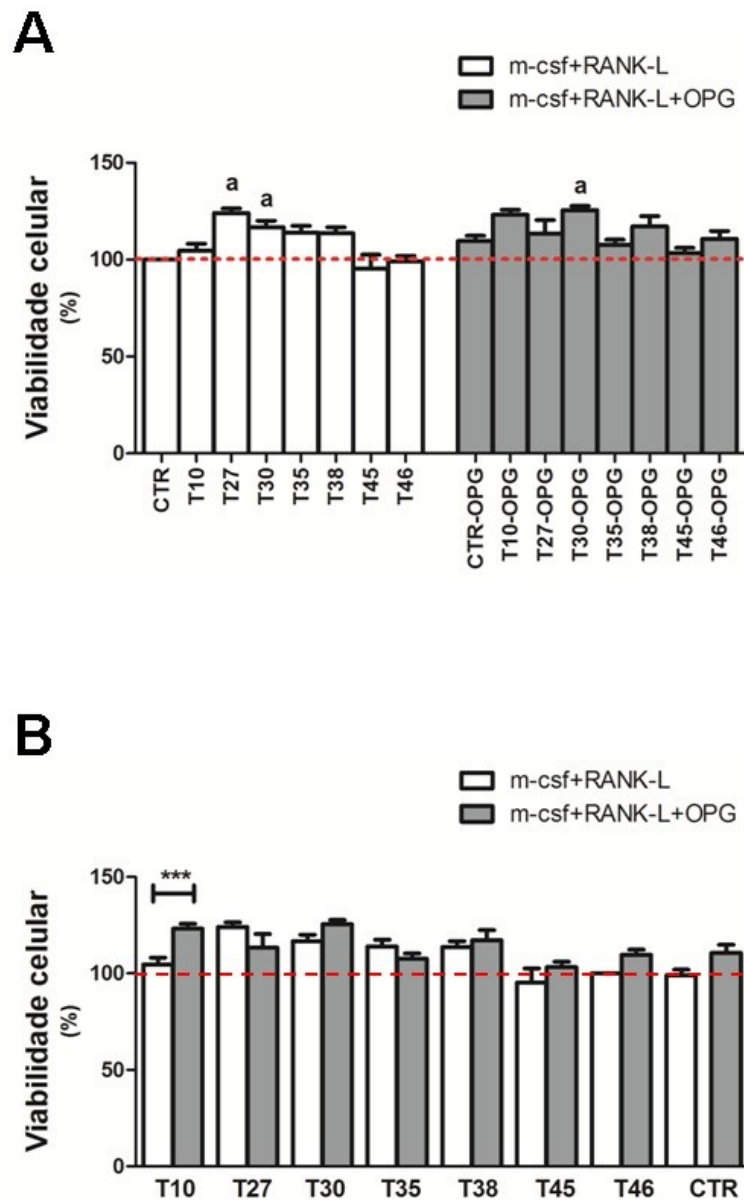


Figura 27. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente menor que os controles.

A fim de avaliar a diferenciação das HSC, a atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) foi quantificada (Figura 28). Não foram observadas diferenças significativas na atividade da TRAP em osteoclastos expostos aos compostos quando comparados aos osteoclastos controles (figura 28).

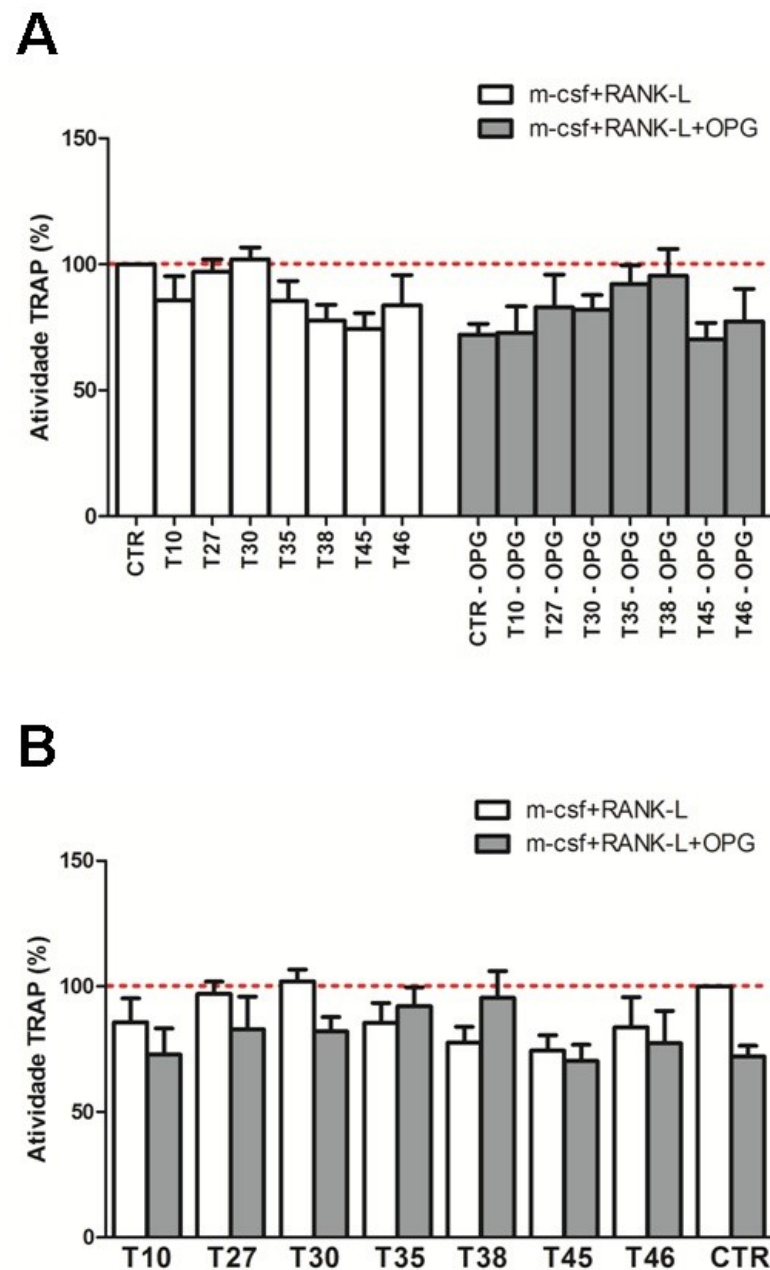


Figura 28. Atividade da fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) em osteoclastos expostos aos compostos. **A.** Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

Em seguida, os osteoclastos foram corados por TRAP (coloração em marsala) concomitantemente à exposição ao substrato da fosfatase para verificar a atividade da TRAP (coloração amarela) (Figura 29). Os osteoclastos expostos aos compostos T10 e T38 apresentaram coloração positiva para TRAP, além da presença de células gigantes e multinucleadas, semelhante às encontradas nos controles (CTR) (Figura 29). Os osteoclastos expostos aos compostos T27, T30, T35, T45 e T46 coraram positivamente pelo TRAP,

entretanto, não foi possível encontrar células gigantes nestas amostras (Figura 29). Todas as amostras apresentaram a fosfatase ácida ativa (Figura 29).

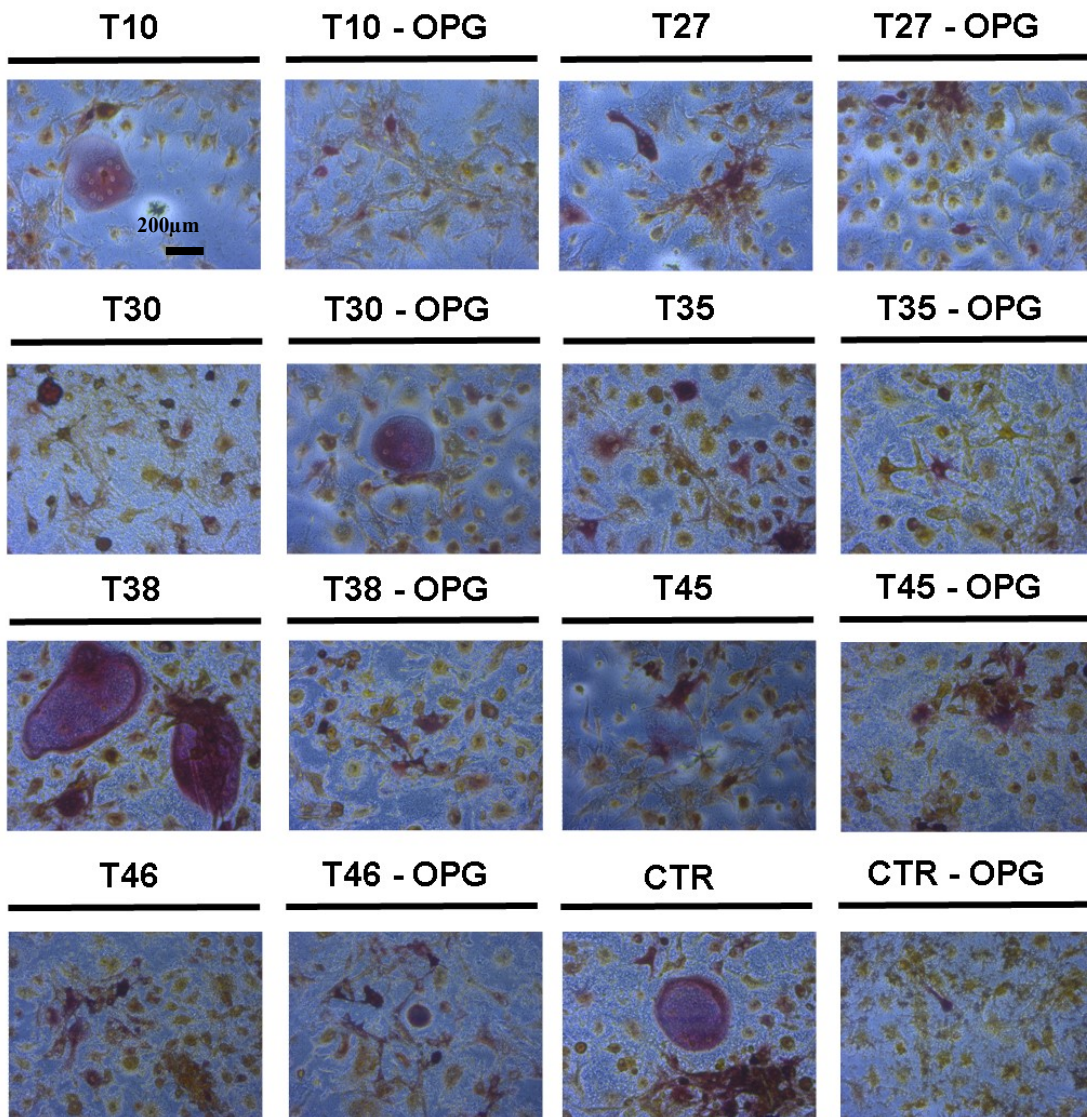


Figura 29. Coloração por TRAP dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. Coloração da TRAP em marsala. A atividade da fosfatase ácida produz um precipitado solúvel amarelo. Aumento: 100x.

Na figura 30 é possível observar as fotomicrografias por microscopia de contraste de fase dos osteoclastos que foram contra corados com DAPI para visualização dos núcleos celulares. Foi observada a formação de células multinucleadas além de vários aglomerados celulares (Figura 30).

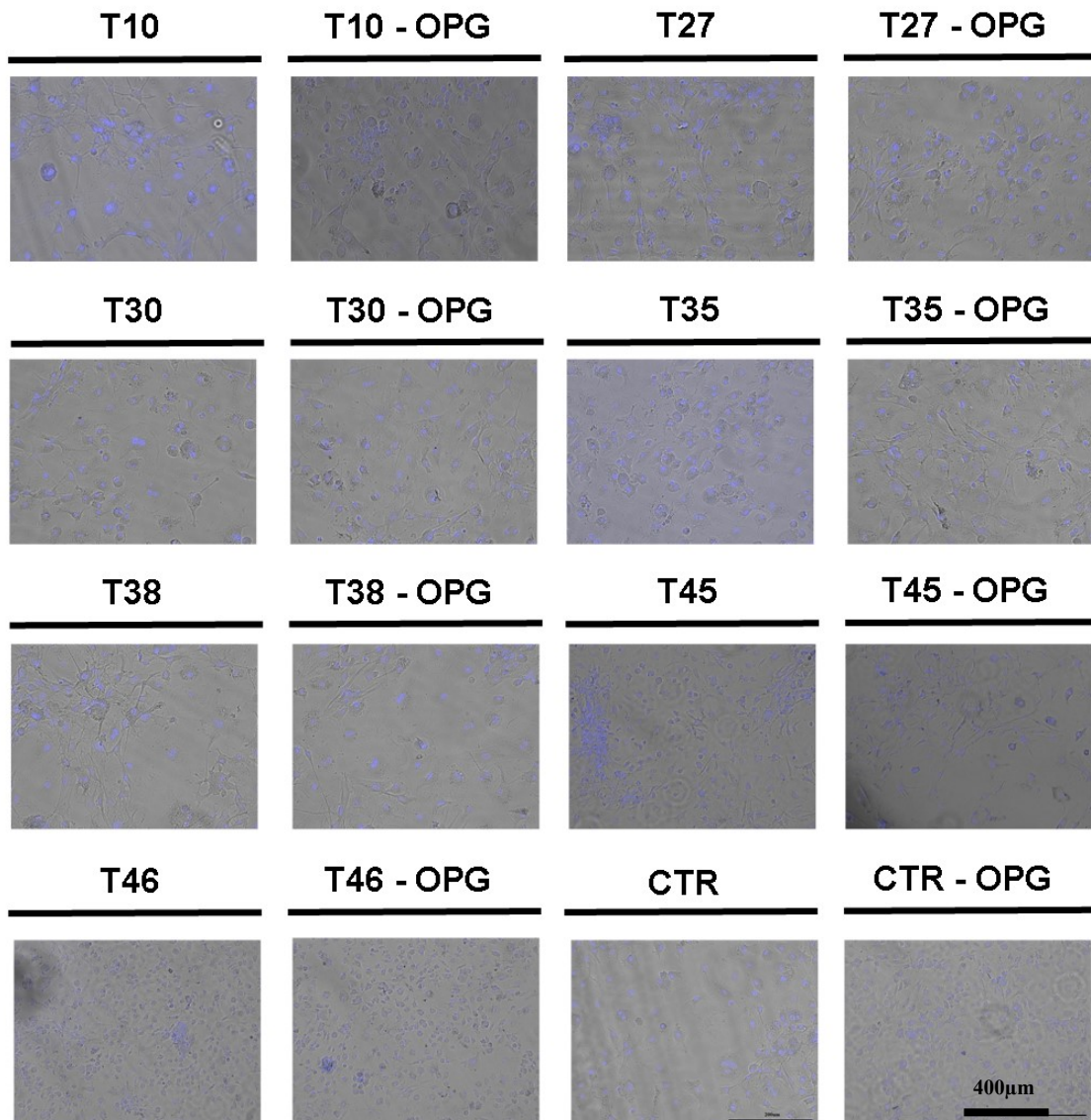


Figura 30. Osteoclastos. Imagens dos osteoclastos em microscópio de contraste de fases contra corados com DAPI. Barra de escala: 200µm.

4.6. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas em cocultura de osteoclastos e osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB)

Foram cultivados 1×10^3 osteoblastos de camundongos C57bl/6 em cocultura com 1×10^3 osteoclastos de camundongos C57bl/6 e após 7 dias de exposição à 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e os compostos na concentração pré-estabelecida ou 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL, 10ng/ml de OPG e os compostos na concentração pré-estabelecida a viabilidade das células foi quantificada (figura 31).

Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade celular dos osteoblastos cultivados em cocultura com os osteoclastos e expostos durante 7 dias de cultivo (Figura 31).

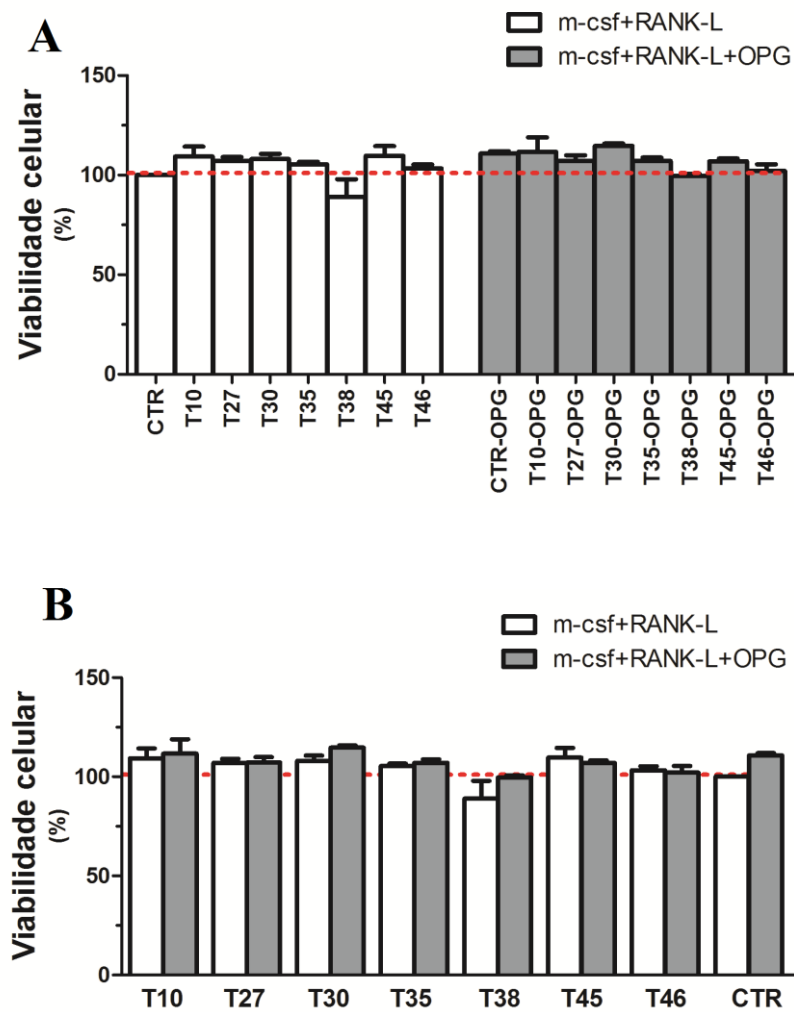


Figura 31. Viabilidade dos osteoclastos em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

Quando comparadas as amostras CTR, os osteoblastos cultivados em conjunto com os osteoclastos expostos às amostras T10 e T45 apresentaram maior atividade da ALP (figura 32).

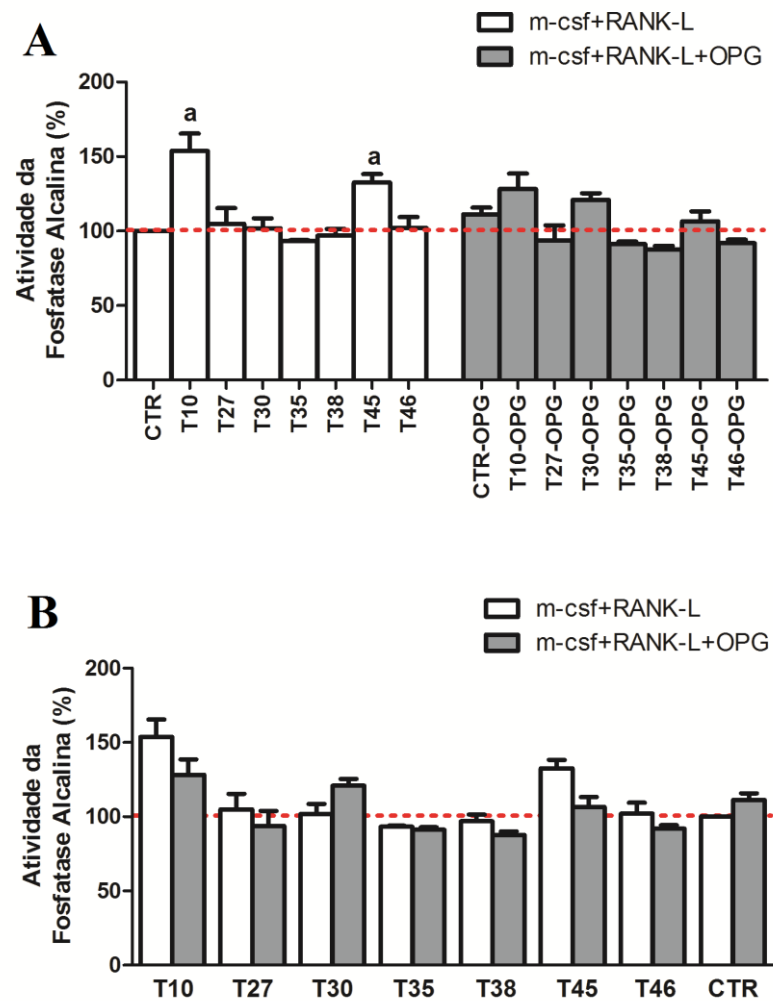


Figura 32. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

Quando comparadas as amostras CTR, os osteoblastos cultivados em conjunto com os osteoclastos expostos às amostras T10 e T45 apresentaram menor produção de colágeno aos 7 dias de cultivo. Em contrapartida, os osteoblastos cultivados em conjunto com os osteoclastos expostos às amostras T35, T35-OPG e T38 apresentaram maior produção de colágeno quando comparadas as amostras CTR aos 7 dias de cultivo. Quando comparadas ao CTR-OPG os osteoblastos cultivados em cocultura com os osteoclastos expostos às amostras T35 apresentaram maior produção de colágeno enquanto os osteoblastos expostos às amostras T10, T10-OPG, T30, T45 e T46 apresentaram menor produção de colágeno aos 7 dias de cultivo (figura 33).

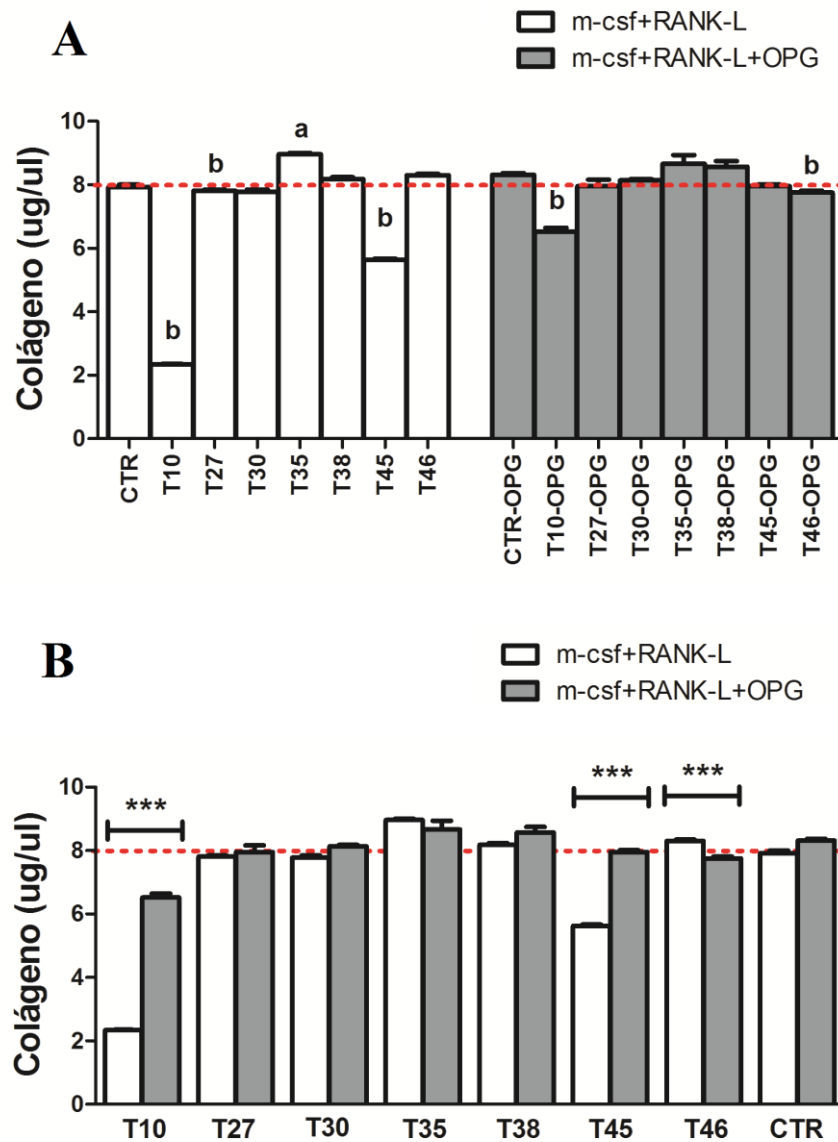


Figura 33. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

Foi observado que os osteoclastos e os osteoblastos cultivados em co-cultura apresentavam a fosfatase ácida ativa mesmo após 7 dias de exposição aos compostos (Figura 34).

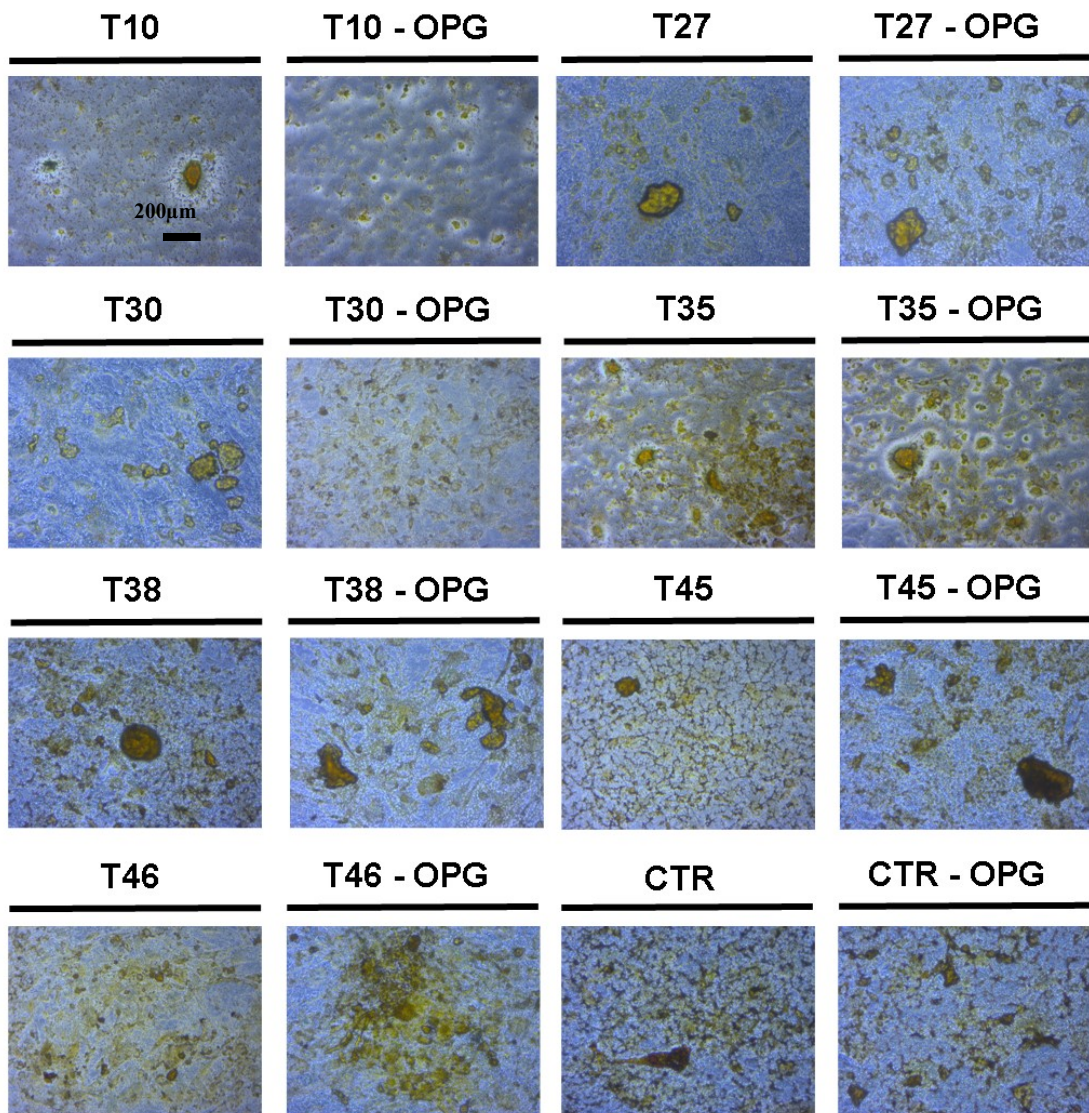


Figura 34. Coloração da atividade da fosfatase ácida (TRAP) em osteoclastos cultivados em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos. A atividade da fosfatase ácida produz um precipitado solúvel amarelo. Aumento: 100x.

A fim de verificar a maturação dos osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos, após 7 dias de cultivo, a co-cultura foi fixada e as células foram coradas pela coloração Von Kossa. As amostras T27, T35 e T38 juntamente com seus pares que receberam a OPG apresentaram fraca coloração pelo Von Kossa (figura 35). Em contrapartida, as amostras T10, T30, T45 e T46 apresentaram vários pontos e regiões de sais de cálcio corados em preto (figura 35).

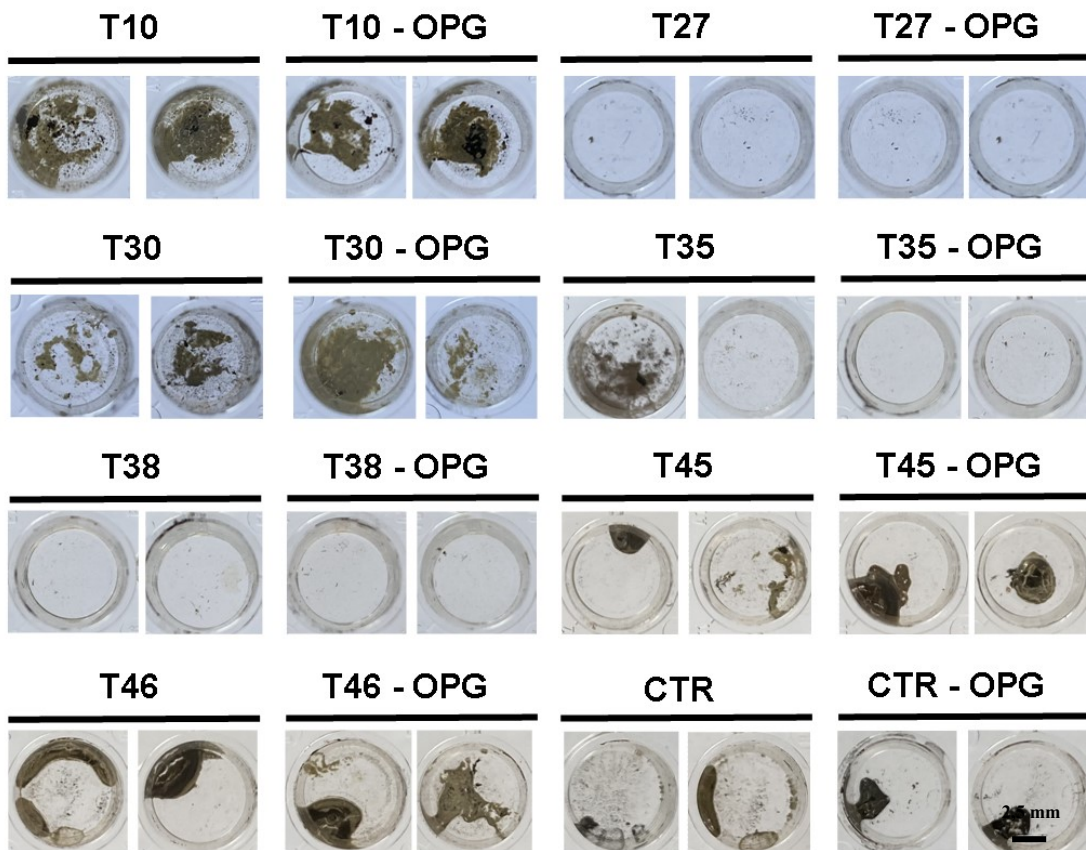


Figura 35. Coloração por *Von Kossa* dos mOB em co-cultura com osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. Os depósitos de cálcio são corados em preto.

Em conjunto, nossos dados indicam que os compostos T10, T30, T45 e T46 são moléculas promissoras para o tratamento da osteoporose, visto os bons resultados nos diferentes modelos celulares. Em contrapartida, as moléculas T27 e T35 não apresentaram efeitos satisfatórios nas culturas com osteoclastos, e o composto T38 não apresentou resultados positivos neste estudo realizado.

5. Discussão

Nosso estudo é pioneiro ao testar 17 novas moléculas inibidoras da catepsina K em três modelos celulares diferentes. Pela primeira vez, foi testado os efeitos dos inibidores da catepsina K na atividade dos osteoblastos e na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas. A intervenção terapêutica como tratamento da osteoporose leva em consideração os resultados do teste de DMO além de vários fatores de risco (22). Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento da osteoporose podem ser classificados em agentes anabólicos, que atuam na formação óssea estimulando a atividade dos osteoblastos e em agentes anti-reabsortivos, que tem como principal mecanismo de ação a redução da reabsorção óssea, por meio da inibição da atividade dos osteoclastos (23). Os melhores medicamentos para

osteoporose devem atuar inibindo a atividade dos osteoclastos enquanto a atividade dos osteoblastos deve permanecer intacta ou melhorada.

Dito isso, nossos primeiros experimentos objetivaram estabelecer a dose ideal de cada composto em cada tipo celular além de promover uma rápida seleção de moléculas promissoras e viáveis em células de origem osteoblástica (rOB e mOB) e células com potencial para se tornarem células ósseas (hASC) (Tabelas 2-4). Na medula óssea há uma variedade de populações celulares (hematopoiéticas e não hematopoiéticas) que, juntas, formam um microambiente responsável pelo bom funcionamento do tecido ósseo (24) e, por isso, é de extrema relevância testar os compostos em vários tipos celulares.

Depois de estabelecida as concentrações ideais para cada tipo celular, nós avaliamos inicialmente a influência dos compostos na viabilidade e atividade de pré-osteoblastos extraídos da calvária de ratos Wistar (rOB), visto que este modelo celular apresenta características importantes que podem ser extrapoladas para o humano. Ratos Wistar é a linhagem mais utilizada em modelos osteoporóticos decorrente de imobilização temporária ou permanente (25). Nossos dados mostram que os compostos T32 e T44 não são moléculas atrativas como tratamento para osteoporose visto que após 14 dias, as amostras apresentaram-se citotóxicas (Figura 6). A duração do tratamento com os agentes anti-osteoporóticos está diretamente relacionado com a segurança e eficácia do fármaco em longo prazo (26, 27). Dados recentes relacionam a eficiência na redução do risco de fratura ao tratamento prolongado com agentes anti-reabsortivos ou agentes anabólicos. Em contrapartida, o uso prolongado de qualquer fármaco aumenta a probabilidade de surgirem efeitos colaterais (26, 27). A Terapatida, por exemplo, é um agente anabólico com uso contínuo limitado há 24 meses (26).

Apesar de apresentarem menor viabilidade, a atividade da ALP dos rOB expostos às amostras T32 e T44 são similares às encontradas nas amostras controle (CTR) (Figura 6). Os osteoblastos utilizados no experimento são células imaturas (pré-osteoblastos) e, no decorrer do cultivo, vão se tornando células maduras, com características de osteócitos. No início do processo de diferenciação dos osteoblastos, a expressão do gene RUNX2 se encontra elevada, culminando na alta expressão da ALP (28). A ALP é um dos primeiros genes a serem expressos durante o processo de mineralização e, no tecido ósseo, é encontrado na membrana celular dos osteoblastos e nas membranas de vesículas na matriz extracelular. É responsável pela hidrólise de pirofosfato inorgânico (PPi) produzindo fosfato inorgânico (Pi) para a

produção de hidroxiapatita (28, 29). Em conjunto, nossos dados mostram que os compostos T32 e T44 não interferem na atividade da fosfatase alcalina quando comparados aos controles e, desta forma, não interferem no início da mineralização óssea dessas células.

Após a maturação celular, os osteoblastos secretam colágeno que formará o osteóide (28, 30). O colágeno I é inicialmente secretado pelas células como procolágeno trimérico solúvel. O pró-colágeno é secretado no espaço extracelular onde os propeptídeos dos terminais N e C são clivados por proteinases resultando no colágeno de hélice tripla monomérico que é incorporado em fibrilas de colágeno insolúveis que, posteriormente, serão mineralizados pela deposição de cristais de hidroxiapatita (31). Dito isso, o colágeno secretado pelos osteoblastos pode ser quantificado (Figura 11) no meio de cultura enquanto o colágeno incorporado pode ser visualizado pela coloração Sírius Red (Figura 12). Desta forma, nossos dados mostraram que o composto T27 apresentou níveis significativamente maiores de secreção de colágeno a partir de 3 dias de cultivo (Figura 11).

Em conjunto, nossos dados mais uma vez demonstram que, nas rOB, os compostos T32 e T44 foram consideradas amostras inviáveis enquanto as amostras T10, T20, T27, T30, T44 e T45 são promissoras pois apresentaram elevada atividade da ALP e elevada secreção de colágeno sugerindo serem compostos que aumentam a atividade metabólica dos osteoblastos auxiliando de forma positiva a mineralização óssea e a produção de matriz extracelular.

Não há na literatura, até o momento, estudos que avaliem o efeito de novos inibidores da catepsina K em células-tronco mesenquimais humanas, tornando este trabalho pioneiro. O uso deste modelo celular no presente trabalho explorou a capacidade dos novos compostos em interferir tanto na diferenciação quanto na citotoxicidade, sendo um modelo altamente relevante e determinante para continuidade dos estudos com perspectiva de realizar testes futuros em humanos. As células-tronco mesenquimais são células estromais com capacidade de se autorenovar e diferenciar em vários tipos celulares (24, 32). Podem ser obtidas de diferentes tecidos, como o cordão umbilical, a polpa dentária, a medula óssea e o tecido adiposo (32). As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (hASC) são facilmente isoladas do tecido adiposo em um protocolo simples e apresentam alto potencial osteogênico (33). Os osteoblastos são derivados de células mesenquimais e compartilham a mesma origem embrionária que as hASC (33) e, teoricamente, esse fato favorece a diferenciação osteogênica das hASC. De fato, o protocolo de diferenciação das hASC em células ósseas é relativamente simplificado e rápido (32). O acréscimo de dexametasona

(Dex), β -glicerofosfato (β -GP) e ácido ascórbico ao meio são suficientes para induzir a diferenciação que é comprovada pelo acúmulo de cálcio e pela atividade da ALP (32).

Durante a diferenciação das hASC, as células recebem meios de cultura contendo diferentes fatores ocasionando a interrupção do processo de proliferação para dar-se início a diferenciação em osteoblastos. Em contrapartida, as hASC indiferenciadas recebem apenas meio basal suplementado e permanecem em constante expansão. Nós observamos que os compostos T10, T20 e T46 estimulam a viabilidade das hASC indiferenciadas em 7 dias de cultivo enquanto os compostos T27, T30, T45, T48 estimulam a proliferação das hASC indiferenciadas após o cultivo prolongado (14 e 21 dias) (Figura 13). Exposições subcrônicas e/ou crônicas a determinados compostos podem levar a auto-regulação celular que cessa a resposta biológica após prolongado estímulo (34). Há fármacos com atividades anti-osteoporóticas, como os bisfosfonatos aminados e o denosumab, que são utilizados por períodos prolongados embora os dados sobre a eficácia anti-fratura e a segurança desses compostos após 5 anos de uso sejam escassos e conflitantes (34, 35). Dito isso, é de extrema importância testar os efeitos citotóxicos de drogas recém sintetizadas por longos períodos e em diferentes tipos celulares, principalmente em células humanas.

Todos os compostos testados nas hASC apresentaram potencial osteogênico (figura 14). No final dos 21 dias de diferenciação, as amostras T20, T46 e T48 apresentaram maior atividade da ALP quando comparadas aos controles que receberam o meio osteogênico indicando sua maior eficiência na diferenciação das hASC. Em contrapartida, as hASC expostas aos compostos T27, T30, T35 e T38 cultivadas com meio osteogênico apresentaram maior atividade da ALP quando comparadas aos controles que receberam o meio osteogênico indicando que esses compostos auxiliaram a diferenciação osteogênica das hASC. A atividade da ALP é um dos primeiros sinais de sucesso na diferenciação osteogênica visto que a ALP é um dos primeiros genes a serem expressos durante o processo de mineralização óssea (28). Em conjunto, nossos dados mostram que, nas hASC, o composto T48 foi considerado inviável enquanto as amostras T20, T27, T30, T35, T38 e T46 são promissoras pois auxiliam a diferenciação osteogênica das hASC.

Os próximos passos para selecionar o melhor composto com atividade anti-osteoporótica foi testar a eficiência dos compostos T10, T27, T30, T35, T38, T45 e T46 durante a maturação de osteoblastos de camundongos C57bl/6 e durante a osteoclastogênese de pré-osteoclastos de camundongos C57bl/6.

Nossos dados indicam que o composto T20 se comportou de modo citotóxico para os mOB após uso prolongado, visto que a viabilidade destas células é significativamente menor quando comparados aos controles (Figura 20). Possíveis efeitos citotóxicos nos osteoblastos durante o tratamento da osteoporose afeta diretamente a eficiência do tratamento da doença, podendo agravar ainda mais o quadro clínico do paciente (22, 36). Sendo assim, para os ensaios com os osteoclastos, foi decidido excluir o composto T20 das análises.

Conforme figura 26 demonstra, nossos dados indicam que os compostos T10, T27, T30 e T38 auxiliam a viabilidade dos precursores de osteoclastos, enquanto os precursores de osteoclastos cultivados com os compostos T45 apresentaram menor viabilidade quando comparados aos grupos controles. Entretanto, todos os precursores apresentaram a fosfatase ácida ativa semelhante aos controles. A catepsina K é a principal protease nos osteoclastos responsável pela degradação do colágeno desmineralizado dentro da lacuna de reabsorção (37). Além disso, já se sabe que a CatK é responsável por ativar a TRAP (37). Zenger et al fornecem evidências de que o processamento e o transporte intracelular de TRAP é regulado pela catepsina K em uma subpopulação de osteoclastos metafisários (38). Os autores correlacionam a ausência da CatK as alterações na expressão, no processamento proteolítico e na secreção da TRAP (38). O processamento proteolítico da TRAP é importante na regulação da atividade catalítica da enzima (37, 38). Nos osteoclastos, a TRAP é sintetizada como um polipeptídeo único com baixa atividade enzimática. A CatK cliva a TRAP em duas subunidades: um fragmento de N-terminal de 21 a 23 kDa e um fragmento C-terminal ligado ao dissulfeto de 16 kDa e com elevada atividade catalítica (37, 38). Nossos compostos foram sintetizados objetivando a inibição da CatK. Sendo assim, os resultados deste trabalho indicam que os compostos T10, T35, T45 e T46 foram capazes de inibir a CatK e, devido a essa inibição, a atividade da fosfatase ácida nos precursores de osteoclastos expostos aos compostos selecionados é semelhante à atividade nos grupos controles-OPG.

Em contrapartida, nossos dados de coloração demonstram que apenas os compostos T10 e T38 apresentam células gigantes, multinucleadas e TRAP positivas, semelhante aos controles (CTR), apesar de todos os compostos apresentarem células TRAP positivas. Janckila *et al* relataram que a proteína TRAP e a atividade TRAP nem sempre se correlacionaram (39), semelhante aos achados do presente trabalho. Os autores observaram que as isoformas estavam presentes no soro de pacientes com reumatismo e doenças renais enquanto apenas a isoforma 5b estava presente nos ossos (39).

Ensaio *in vivo* demonstram que a expressão de RANKL e OPG pelos osteoblastos é coordenada, atuando no controle da reabsorção e densidade mineral óssea via ativação de RANK em osteoclastos (9). Sendo assim, avaliamos os efeitos dos compostos em ensaios de co-cultura com osteoblastos e precursores de osteoclastos. Nossos dados mostram que os osteoblastos cultivados com as amostras T10 e T45 apresentaram maior atividade da ALP, coloração positiva de depósitos de cálcio e menor produção de colágeno, indicando que os compostos favorecem a maturação óssea dos osteoblastos em co-cultura com os osteoclastos, mantendo os osteoblastos ativos e em prolongado período de maturação óssea. *In vivo*, a ALP é produzida no início da mineralização óssea e participa ativamente da deposição de cálcio durante o processo de mineralização, sendo a sua expressão regulada com o aumento da expressão de osteocalcina (28). Em conjunto, os ensaios de co-cultura apresentam os compostos T10, T35, T45 e T46 como moléculas promissoras no tratamento da osteoporose.

De modo geral, o presente estudo é pioneiro ao testar novos compostos baseados no esqueleto molecular do Balicatib, desenhados para atuar como inibidores da catepsina K. Foi realizado uma série de seleções desses novos compostos em células ósseas de ratos e camundongos, em células humanas com potencial osteogênico e com precursores de osteoclastos derivados da medula óssea de camundongos. Os compostos T32 e T44 se apresentaram como compostos citotóxicos para os osteoblastos de ratos Wistar quando utilizados em longos períodos na cultura e, portanto, foram excluídos dos nossos estudos. O composto T48 não promoveu benefício às células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo.

6. Conclusão

Sendo assim, com este trabalho podemos concluir que os compostos T10, T35, T45 e T46 são moléculas promissoras no tratamento da osteoporose com ação inibitória em osteoclastos e boa ativação osteoblástica. Ainda assim, novos ensaios são necessários para elucidar a interação entre os compostos produzidos e a catepsina K visando à aplicação *in vivo*.

7. Perspectivas

- ❖ Analisar as moléculas em ensaios de reabsorção.
- ❖ Avaliar a expressão gênica do gene da catepsina K em precursores de osteoclastos e osteoclastos expostos aos compostos.

- ❖ Análises da formação de anéis de f-actina em osteoclastos expostos as moléculas selecionadas, pelos ensaios de imunofluorescência.
- ❖ Analisar os efeitos das moléculas selecionadas em osteoclastos cultivados em matriz de colágeno tipo I.
- ❖ Testar os efeitos das moléculas promissoras *in vivo* em modelo animal hígido e osteoporótico.
- ❖ Associar as moléculas promissoras à biomateriais para recuperação óssea e entrega direcionada.

8. Referências Bibliográficas

1. Armas LA, Recker RR. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2012;41(3):475-86.
2. Newton-John HF, Morgan DB. OSTEOPOROSIS : DISEASE OR SENESCENCE ? *The lancet*. 1968;291(7536):232-3.
3. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocrine reviews*. 2017;38(4):325-50.
4. Helali AM, Iti FM, Mohamed IN. Cathepsin K inhibitors: a novel target but promising approach in the treatment of osteoporosis. *Current drug targets*. 2013;14(13):1591-600.
5. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:433.
6. Novinec M, Lenarcic B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biological chemistry*. 2013;394(9):1163-79.
7. Bromme D, Okamoto K. Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 1995;376(6):379-84.
8. Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, et al. Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Advances in experimental medicine and biology*. 2000;477:293-303.
9. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
10. Thompson SK, Halbert SM, Bossard MJ, Tomaszek TA, Levy MA, Zhao B, et al. Design of potent and selective human cathepsin K inhibitors that span the active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(26):14249-54.
11. Leung-Toung R, Zhao Y, Li W, Tam TF, Karimian K, Spino M. Thiol proteases: inhibitors and potential therapeutic targets. *Current medicinal chemistry*. 2006;13(5):547-81.
12. Ren XF, Li HW, Fang X, Wu Y, Wang L, Zou S. Highly selective azadipeptide nitrile inhibitors for cathepsin K: design, synthesis and activity assays. *Organic & biomolecular chemistry*. 2013;11(7):1143-8.
13. Ryu J, Kim HJ, Chang EJ, Huang H, Banno Y, Kim HH. Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO journal*. 2006;25(24):5840-51.
14. Ishii M, Kikuta J. Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1831(1):223-7.

15. Alvarenga EC, Rodrigues R, Caricati-Neto A, Silva-Filho FC, Paredes-Gamero EJ, Ferreira AT. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. *Bone*. 2010;46(2):355-62.
16. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
17. Rodrigues-Ribeiro R, Alvarenga EC, Calio ML, Paredes-Gamero EJ, Ferreira AT. Dual role of P2 receptors during osteoblast differentiation. *Cell biochemistry and biophysics*. 2015;71(2):1225-33.
18. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *BoneKey reports*. 2014;3:570.
19. Wang J, Stern PH. Osteoclastogenic activity and RANKL expression are inhibited in osteoblastic cells expressing constitutively active Galpha(12) or constitutively active RhoA. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111(6):1531-6.
20. Beeton CA, Bord S, Ireland D, Compston JE. Osteoclast formation and bone resorption are inhibited by megakaryocytes. *Bone*. 2006;39(5):985-90.
21. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Shakibaei M. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochemistry and cell biology*. 2009;131(2):251-66.
22. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10169):364-76.
23. Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2017;25(1):2.
24. de Alvarenga EC, Silva WN, Vasconcellos R, Paredes-Gamero EJ, Mintz A, Birbrair A. Promyelocytic leukemia protein in mesenchymal stem cells is essential for leukemia progression. *Annals of hematology*. 2018;97(10):1749-55.
25. Komori T. Animal models for osteoporosis. *European journal of pharmacology*. 2015;759:287-94.
26. Meier C, Uebelhart B, Aubry-Rozier B, Birkhauser M, Bischoff-Ferrari HA, Frey D, et al. Osteoporosis drug treatment: duration and management after discontinuation. A position statement from the SVGO/ASCO. *Swiss medical weekly*. 2017;147:w14484.
27. Laster AJ, Tanner SB. Duration of treatment in postmenopausal osteoporosis: how long to treat and what are the consequences of cessation of treatment? *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2011;37(3):323-36, v.
28. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
29. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(12).
30. Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2016;52-54:78-87.
31. Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):98-105.
32. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*. 2011;20(1):5-14.
33. Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 2013;129:59-71.
34. Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The lancet Diabetes & endocrinology*. 2017;5(11):898-907.

35. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones*. 2009;8(2):96-110.
36. Reszka AA, Rodan GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Current osteoporosis reports*. 2003;1(2):45-52.
37. Janckila AJ, Yam LT. Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases: new perspectives on an old enzyme. *Calcified tissue international*. 2009;85(6):465-83.
38. Zenger S, Hollberg K, Ljusberg J, Norgard M, Ek-Rylander B, Kiviranta R, et al. Proteolytic processing and polarized secretion of tartrate-resistant acid phosphatase is altered in a subpopulation of metaphyseal osteoclasts in cathepsin K-deficient mice. *Bone*. 2007;41(5):820-32.
39. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clinical chemistry*. 2001;47(1):74-80.

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DERIVADOS bis-1,2,3-triazólicos NA OSTEOGÊNESE E OSTEOCLASTOGÊNESE

1. Introdução

Após diagnosticada, a osteoporose e estabelecido os riscos de fratura é necessário iniciar o tratamento profilático e/ou curativo da osteoporose. O tratamento para osteoporose inclui a administração de fármacos classificados como anti-reabsortivos ou anabólicos. Os fármacos anti-reabsortivos são os mais utilizados atualmente em terapias anti-osteoporose, como abordado no capítulo anterior deste trabalho. Estes agentes atuam no processo de reabsorção óssea inibindo principalmente a ação dos osteoclastos, por diferentes mecanismos (1). Dentre os fármacos classificados como anti-reabsortivos, os bisfosfonatos são atualmente a classe de droga recomendada como primeira linha de medicamentos para o tratamento de pacientes com osteoporose (2).

Os bisfosfonatos (BFs) possuem uma estrutura química geral no qual apresentam um átomo de carbono central tetraédrico ligado a dois grupos fosfonatos e grupos R^1 e R^2 variados (2, 3). As variações nos grupos R^1 e R^2 irão influenciar a atividade e o mecanismo de ação dos BFs, entretanto, a ligação P-C-P é a principal responsável pela afinidade dos bisfosfanatos aos cristais de hidroxiapatita (2, 4). Depois de adsorvidos nos minerais ósseos, os BFs são lentamente eliminados pelo organismo, pois ficam aprisionados nas lacunas de reabsorção sendo constantemente liberados e readsorvidos nos cristais de hidroxiapatita (5).

Apesar de serem os fármacos da primeira geração, essenciais no tratamento da osteoporose e os mais utilizados no tratamento desta doença, os BFs causam diversos efeitos colaterais, como irritação no esôfago e problemas gastrointestinais (6), osteonecrose de mandíbula (7) e fibrilação atrial (8). A fim de minimizar os efeitos colaterais causados pelas terapias em uso no mercado, pesquisas destinada à síntese de novos compostos anti-osteoporóticos tornaram-se promissoras. Dentre esses grupos, os compostos contendo o anel-1,2,3-triazólico têm chamado atenção pelos seus efeitos anti-osteoclastogênico (9).

1.1 Derivados bis-1,2,3-triazólicos

O anel-1,2,3-triazólico é um composto sintético, não encontrado na natureza e desde a sua produção vem sendo empregado na síntese de novos compostos e funcionalização com diferentes substâncias com conhecida atividade antimicrobiana, antifúngica e anticancerígena (9). O anel-1,2,3-triazólico é um forte candidato à agente biológico visto que apresenta alta

estabilidade metabólica, podem se comportar como bioisómero e aceptor de ligação de hidrogênio, podendo ser aplicados em estratégias de hibridação molecular, potencializando compostos que já possuem atividade comprovada (10, 11).

Os ácidos bisfosfônicos constituem uma classe de compostos que exibem uma ampla variedade de atividades biológicas. Contudo, a meia-vida esquelética destes compostos é prolongada e não há dados sobre a sua segurança com o uso contínuo (8, 9). Um campo de estudos que têm se destacado na síntese desses novos compostos é a substituição de grupos fosfonatos pelo núcleo triazólico visando à produção de novos compostos bioativos (8, 9, 12). Marshall *et. al* (2013) sintetizaram compostos contendo o anel 1,2,3-bis-triazóis derivados de ácidos carboxílicos com variação do tamanho da cadeia alquílica. *In vitro*, os compostos foram capazes de inibir a osteoclastogênese, com uma eficiência duas vezes maior que a osteoprotegerina (OPG) (8).

Dito isso, cresceu o interesse na síntese de novos compostos derivados de 1,2,3-bis-triazóis simétricos e assimétricos contendo espaçadores oriundos de dialcinos ou diazidas entre os pesquisadores da química geral. O uso de diferentes espaçadores na produção dos compostos altera a solubilidade, atividade e conformação dos compostos obtidos. Nosso trabalho buscou testar a eficiência anti-osteoclastogênica de novos compostos 1,2,3-bis-triazólicos com diferentes espaçadores e substituintes contendo grupos ácidos carboxílicos, objetivando eleger o composto mais eficiente em testes *in vitro*, como promissores compostos para o tratamento da osteoporose.

2. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de derivados bis-1,2,3-triazólicos durante a maturação de osteoblastos e osteoclastos de roedores e durante a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteócitos

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a viabilidade e maturação de rOB e mOB na presença de derivados bis-1,2,3-triazólicos;
- Avaliar a viabilidade de mOB em co cultura com os osteoclastos na presença de derivados bis-1,2,3-triazólicos;
- Avaliar a osteoclastogênese de HSC na presença de derivados bis-1,2,3-triazólicos;

3. Materiais e Métodos

3.1. Derivados bis-1,2,3-triazólicos

As moléculas analisadas neste trabalho foram produzidas durante o doutorado do aluno Wallace Júnio Reis, sob orientação da professora Dra. Rossimiriam Pereira de Freitas, do departamento de Química, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram sintetizados 16 derivados 1,2,3-bistriazólicos-1,4-dissubstituídos contendo diferentes espaçadores (Figura 1), identificadas por W17, W24, W30, W31, W32, W33, W34, W35, W36, W53, W54, W56, W62, W64, W70 e W82 com atividades anti-osteoclastogênica.

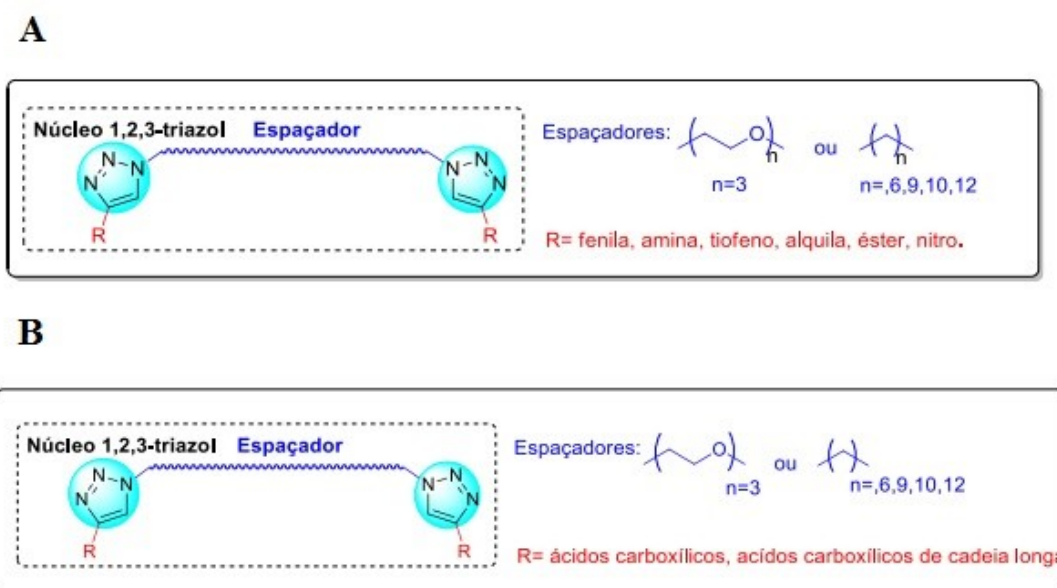


Figura 1. Esqueletos moleculares dos 1,2,3-bistriazólicos-1,4-dissubstituídos contendo diferentes espaçadores. A. Compostos do tipo 1,2,3-bis-triazóis contendo espaçadores alifáticos e oxigenados, diversamente funcionalizados. **B.** Compostos 1,2,3-bis-triazóis derivados de ácidos carboxílicos. Os núcleos 1,2,3-triazóis são funcionalizados com os radicais representados por R (em vermelho). Os espaçadores utilizados estão discriminados em azul.

3.2. Comitê de Ética

Os ensaios de citocompatibilidade, maturação celular e diferenciação *in vitro* foram realizados com a cultura primária de osteoblastos extraídos do calvário de ratos Wistar ($n=5$), camundongos C57/bl6 ($n=5$) neonatos com 3 a 5 dias de idade (13) e com células-tronco mesenquimais humanas extraídas de tecido adiposo (13). O uso dos osteoblastos oriundos dos ratos Wistar foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) sob protocolo 009/2018. O uso dos osteoblastos oriundos dos camundongos C57/bl6 foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas

Gerais (UFMG) sob protocolo 288/2014. O uso das células-tronco mesenquimais foi aprovado pelo comitê de ética da pró-reitoria de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (C.A.A.E) 266.925.

3.3. Extração de osteoblastos

Ratos Wistar neonatos de 3 a 5 dias e camundongos C57bl/6 foram eutanasiados por dose letal de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Cristália). Em seguida, foi feito um recorte bilateral das peles dos animais, a partir da rima ocular até as orelhas, possibilitando a exposição das calvárias. Após a retração da pele, as calvárias foram recortadas na região de sutura ao redor dos ossos parietais, destacadas e armazenadas em tampão fosfato salino (PBS) contendo 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®) e 1mg/mL de estreptomicina (Gibco®). Posteriormente, as calvárias foram fragmentadas com o auxílio de uma tesoura e submetidas a tratamento enzimático em 1% de tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Gibco®) por 10 min. Em seguida, as amostras foram incubadas com 2% de colagenase (Millipore®), em 4 banhos sequenciais, por 20 min cada a 37 °C. Os últimos três banhos de colagenase foram centrifugados e o pellet foi ressuspenso em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – DMEM (Gibco®) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), penicilina (100 UI / ml - Gibco®) e estreptomicina (100 mg / ml - Gibco®) e transferido para frascos de cultura de células T25. As células foram levadas a crescer em uma incubadora a 37 ° C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Todos os experimentos foram conduzidos na quinta passagem celular.

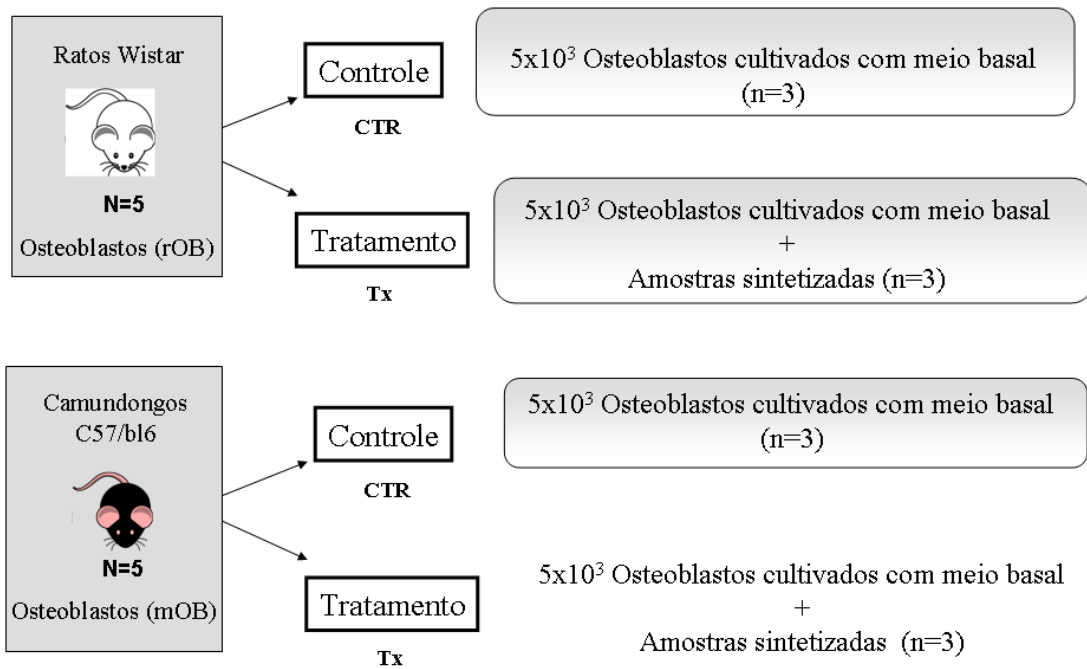
3.4. Extração de células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC)

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) foram extraídas de lipoaspirado de paciente do sexo masculino, de 42 anos, 115 quilos, 183 centímetros de altura, que se submeteu ao procedimento de lipoaspiração. A clínica responsável pelo procedimento foi a Clínica Patrícia Leite, e as cirurgias foram realizadas no Hospital LifeCenter, localizada no bairro Serra, em Belo Horizonte e coordenada pela Dra. Patrícia Leite e os procedimentos foram seguidos de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Parecer nº ETIC - 0107.0.203.000-10). O material foi cedido ao Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia da UFMG.

O lipoaspirado foi retirado dos flancos direito e esquerdo e regiões infra e supraumbilical, transferido para recipientes de 200 mL de vidros contendo 1 mg/mL de estreptomicina (Gibco®), 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®) e 3 µg/ mL de gentamicina (Gibco®) transportado para o Laboratório de Sinalização Celular e Nanobiotecnologia para processamento em fluxo laminar, em condições estéreis, conforme descrito por Zuk et al. (14). O lipoaspirado foi separado em porções de aproximadamente 20 mL em tubos falcon estéreis de 50 mL e lavado com meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium – DMEM (Gibco®) sem soro sobre centrifugação de 252x g por 6 minutos a temperatura ambiente (14). Após a centrifugação, a porção superior contendo a gordura foi separada e submetida à digestão com colagenase do tipo I (Millipore®) em uma concentração de 0,1% em PBS, pH 7,4, na proporção de 1:1 para digerir a matriz extracelular. Os tubos foram mantidos a 37°C, 5% CO₂ por duas horas e a cada 15 minutos, os tubos foram agitados vigorosamente. Seguida as duas horas de digestão, os tubos foram centrifugados 252 g por 6 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi descartado e a porção estromal foi ressuspendida em meio DMEM completo (10% SFB (Gibco®), 1000 unidades/mL de penicilina (Gibco®), 1 mg/mL de estreptomicina (Gibco®) e 3 µg/ mL de gentamicina (Gibco®)). O meio de cultura foi substituído a cada dois dias para retirada de gotículas de gordura, células sanguíneas e células não aderentes.

3.5. Grupos Experimentais

O fluxograma abaixo sintetiza os grupos experimentais utilizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos.

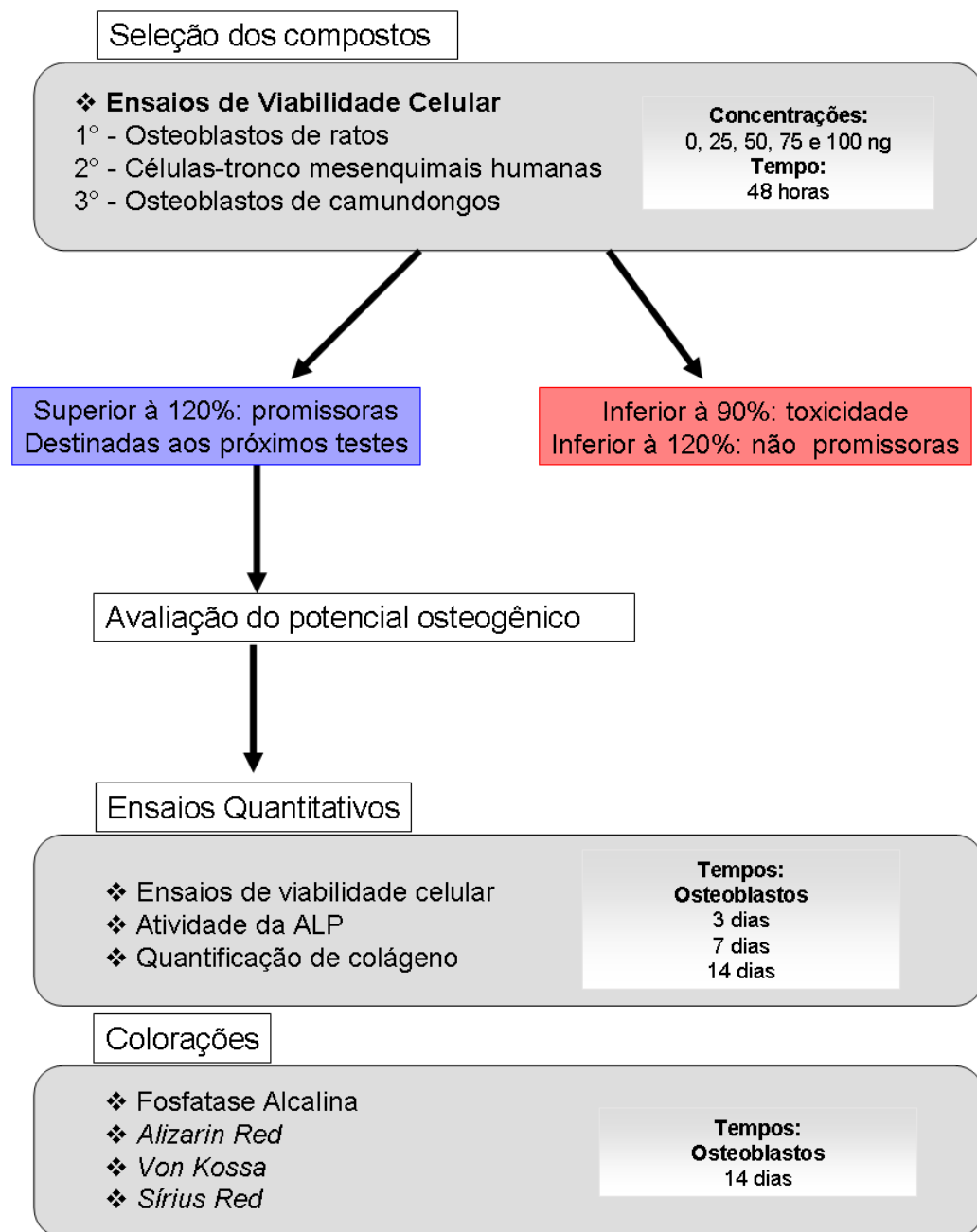


Meio Basal: Meio DMEM + 10% SFB + 1% streptomicina, 1% penicilina

Fluxograma 1. Síntese dos grupos experimentais com osteoblastos utilizados neste capítulo.

3.6. Teste de citocompatibilidade em osteoblastos e hASC

O fluxograma abaixo sintetiza os experimentos realizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos. Foram realizados ensaios de viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina e produção de colágeno. Além disso, foram realizadas colorações por *Alizarin Red*, *Von Kossa* e *Sírius Red*. Os ensaios citados estão detalhadamente descritos no capítulo 1 deste trabalho.



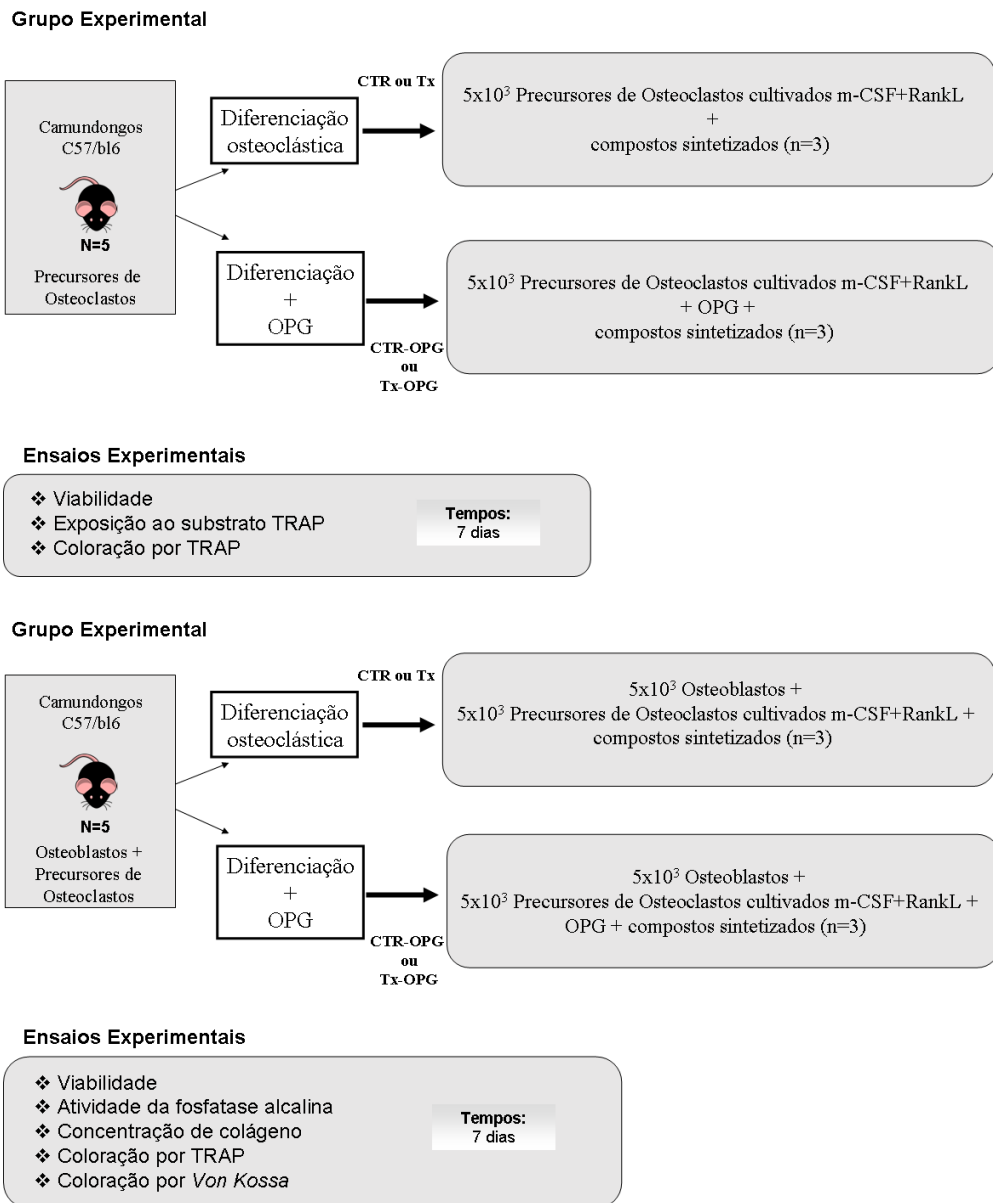
Fluxograma 2. Síntese dos experimentos realizados neste capítulo em osteoblastos de ratos e camundongos, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos.

3.7. Isolamento dos precursores de osteoclastos

Os precursores de osteoclastos foram isolados segundo protocolo estabelecido por Rucci et. al (12). Resumidamente, camundongos C57/BL6 neonatos de 3 a 5 dias foram eutanasiados e limpos com álcool 70% e solução de iodopovidona. Os membros posteriores foram coletados e transferidos para uma placa de petri estéril contendo meio basal. Em seguida, os tecidos moles foram cuidadosamente removidos do membros e os ossos limpos foram colocados em uma placa de petri com meio basal. Os ossos foram finalmente cortados,

expondo a medula óssea que foi mecanicamente isolada dos fragmentos ósseos. O meio basal contendo as células da medula óssea foi coletado e centrifugado a 300 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células foram ressuspensas em novo meio basal e semeadas em garrafa de cultura.

O fluxograma abaixo sintetiza os experimentos realizados neste capítulo em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos.



Fluxograma 3. Síntese dos experimentos realizados neste capítulo em células precursoras de osteoclastos de camundongos C57bl6, obedecendo a ordem cronológica e os passos seqüenciais dos mesmos.

3.8. Diferenciação osteoclástica

Foram semeados 5×10^3 células precursoras de osteoclastos em placas de 48 wells e cultivadas por 14 dias com meio DMEM suplementado e enriquecido com 25 ng/ml de m-CSF e 10 ng/ml de RANKL. Metade do meio foi renovado a cada 48 horas. Durante a diferenciação dos osteoclastos foram adicionados os peptídeos selecionados juntamente com 10ng/mL de osteoprotegerina (OPG). A OPG atua como controle negativo, visto que a OPG impede a ligação do RANK ao seu ligante RANKL e, conseqüentemente, inibe a formação e a atividade dos osteoclastos.

3.9. Coloração por TRAP

Após os 5 dias de diferenciação, os osteoclastos foram fixados com PFA 4% por 20 min a T.A. Em seguida, as células foram lavadas 2x com PBS e os poços foram secos. Após a secagem, as células foram incubadas durante 30 min com 100 μ l de substrato TRAP (substrato fosfatase, cat # P4744, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) em tampão contendo 50 mM de citrato de sódio/ 10 mM de tartarato de sódio, pH 4,6. Após 30 min foi adicionado 100 μ l de NaOH 0,1 N e a absorbância foi mensurada em 410 nm. Para observar a formação de células multinucleadas, as células foram fixadas com PFA 4% por 20 min e posteriormente as células foram coradas durante 4 horas com 200 μ L de solução de reação TRAP (5 mg de fosfato de naftol AS-MX (Sigma-Aldrich) dissolvido em 0,5 ml de N, N-dimetilformamida) solubilizados em 50 ml de tampão composto por 100mM de acetato de sódio/50mM de tartarato de sódio pH 5,0 e 30 mg de Fast Violet LB (Sigma-Aldrich). Foram consideradas células diferenciadas as células com três ou mais núcleos (12).

3.10. Ensaio de co-cultura

Foram semeadas 5×10^3 osteoblastos de camundongos c57/bl6 em placas de 96 wells. Após 24 horas, 5×10^3 células precursoras de osteoclastos foram semeados nesses mesmos poços e ambas as células foram cultivadas por 5 dias com meio DMEM suplementado e enriquecido com 25 ng/ml de m-CSF e 100 ng/ml de RANKL. Após os 5 dias de cultivo, as células foram cultivadas e foram avaliados a viabilidade dessas células e a atividade da fosfatase alcalina. Os poços foram corados por TRAP e pela coloração *Alizarin Red S* (15).

3.11. Análise qualitativa das fotomicrografias.

As análises qualitativas das colorações *Alizarin Red S*, *Von Kossa* e *Sírius Red* foram realizadas na objetiva por meio de um *Score* elaborado, utilizando o parâmetro definido na tabela 1.

Tabela 1. Legenda do *score* da intensidade das colorações utilizadas para comparação entre as diferentes amostras utilizadas.

Score	Intensidade da coloração nas células
-	Ausência
+	Mínimo
++	Pouco
+++	Moderada
++++	Elevada

3.12. Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos foram representados pela média \pm o desvio padrão. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Student't não pareado e o teste ANOVA utilizando-se GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, Software GraphPad, La Jolla California, USA.

4. Resultados

4.1. Seleção dos compostos

A fim de selecionar as amostras mais promissoras dentre as 16 amostras e padronizar a concentração ideal de cada amostra durante os ensaios subsequentes, foi realizado um ensaio de viabilidade, utilizando os osteoblastos de ratos Wistar (rOB), as células-tronco mesenquimais humanas (hASC) e os osteoblastos de camundongos C57/bl6 (mOB).

Os modelos celulares rOB, hASC e mOB (Tabela 2, 3 e 4 respectivamente) foram expostos às concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100 ng/ml de cada amostra, identificadas por W17, W24, W30, W31, W32, W33, W34, W35, W36, W53, W54, W56, W62, W64, W70 e W82. Após 48 horas de exposição, a viabilidade das células foi mensurada por meio do reagente resazurina e a concentração de cada amostra foi estabelecida. Os dados foram normalizados para porcentagem e a viabilidade dos rOB que receberam não foram expostos às amostras (concentração de 0 ng) foram considerados os controles positivos (100%). Todas as amostras foram consideradas promissoras para as rOB e hASC, visto que todas apresentaram viabilidade superior a 120% (Tabela 2 e 3). Em contrapartida, os mOB quando expostos por 48hs às amostras W34, W53, W62, W64, W70 e W82 apresentaram viabilidades inferiores a 120% e, assim, estas amostras não foram consideradas moléculas promissoras e, portanto, foram excluídas das nossas análises (Tabela 4).

Tabela 2. Viabilidades dos rOB após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
W17	100	177,308	141,341	133,034	106,905
W24	100	181,814	237,551	211,497	207,187
W30	100	177,576	208,989	200,632	193,17
W31	100	200,887	234,365	203,698	205,988
W32	100	218,253	247,264	246,131	200,492
W33	100	197,319	206,739	201,227	212,776
W34	100	229,532	238,132	203,53	207,437
W35	100	226,46	235,859	225,111	228,815
W36	100	215,582	227,415	208,858	205,041
W53	100	182,367	226,413	213,755	216,567
W54	100	166,2	207,476	186,997	226,936
W56	100	214,927	244,716	238,996	226,492
W62	100	206,365	225,162	212,346	202,622
W64	100	219,708	230,993	216,71	213,746
W70	100	221,607	228,092	198,349	225,581
W82	100	149,139	154,931	133,738	127,32

Tabela 3. Viabilidades das hASC após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
W17	100	142,139	150,931	131,738	124,32
W24	100	140,48	131,606	122,999	163,401
W30	100	157,872	139,205	129,274	154,222
W31	100	147,969	108,703	115,611	166,889
W32	100	138,288	136,356	143,808	169,783
W33	100	147,349	126,781	126,059	168,7
W34	100	153,649	143,449	123,604	154,805
W35	100	166,347	143,557	140,278	154,639
W36	100	176,949	145,904	139,402	174,784
W53	100	148,65	130,239	139,299	143,972
W54	100	128,672	122,055	121,712	158,014
W56	100	150,96	129,782	135,06	172,848
W62	100	139,517	153,726	129,432	151,297
W64	100	149,405	156,348	138,311	170,594
W70	100	156,016	134,337	136,997	174,789
W82	100	165,367	139,289	147,516	126,095

Tabela 4. Viabilidades das mOB após 48 horas de exposição às amostras. Os dados de viabilidade foram normalizados para porcentagem (%). Os dados são expressos com a média \pm SEM, n=3.

Amostras	Concentração				
	0 ng	25 ng	50 ng	75 ng	100 ng
W17	100	130,123	125,575	109,775	115,787
W24	100	84,7612	84,6652	95,0625	119,556
W30	100	147,411	146,213	136,618	171,8
W31	100	98,7957	104,662	111,807	127,328
W32	100	91,4192	104,685	99,7635	139,633
W33	100	115,177	115,309	101,237	134,732
W34	100	84,552	92,509	83,1732	99,2844
W35	100	114,575	120,471	112,415	121,286
W36	100	133,398	135,933	129,168	123,925
W53	100	101,656	104,008	100,111	92,7257
W54	100	96,916	93,1685	91,933	119,335
W56	100	99,7003	119,25	100,653	106,621
W64	100	83,9396	89,9416	93,4804	105,416
W70	100	100,287	111,497	110,482	99,7602
W82	100	91,7827	92,9405	81,7348	78,7955

A partir dos ensaios de viabilidade, foi determinada a concentração que cada molécula seria utilizada nos ensaios seguintes conforme demonstrado pela Tabela 5.

Tabela 5. Concentração de uso de cada molécula selecionada para cada modelo celular.

Amostras	Concentração de Uso		
	rOB	hASC	mOB
W17	25 ng	50 ng	25 ng
W24	50 ng	100 ng	100 ng
W30	50 ng	25 ng	100 ng
W31	50 ng	100 ng	100 ng
W32	50 ng	100 ng	100 ng
W33	100 ng	100 ng	100 ng
W35	50 ng	25 ng	100 ng
W36	50 ng	25 ng	50 ng
W54	100 ng	100 ng	100 ng
W56	50 ng	100 ng	50 ng

Determinado a concentração ideal de cada molécula nos tipos celulares específicos, foi avaliado o potencial osteogênico de cada molécula nos rOB.

4.2 Potencial osteogênico das moléculas nos rO

Após 14 dias de ensaio, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade de rOB, atividade da ALP do meio de cultura e nos rOB cultivados com os compostos quando comparada a viabilidade e atividade de ALP, tanto do meio quanto nas células, dos rOB cultivados apenas com meio basal (CTR) (Figura 2).

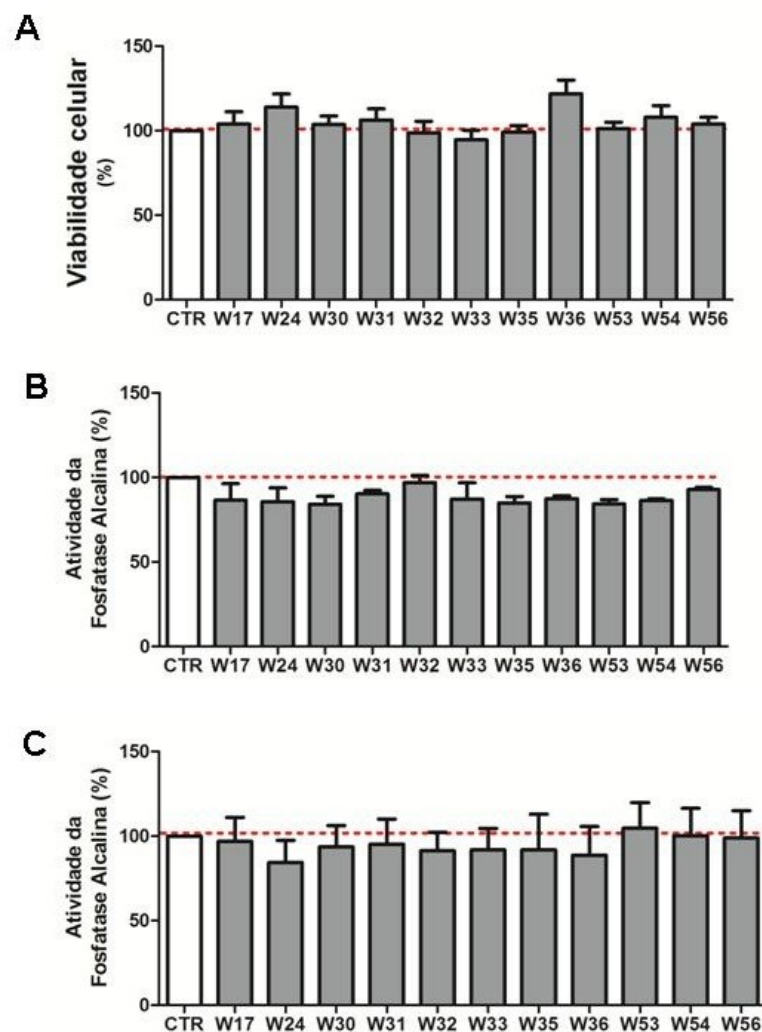


Figura 2. Efeito dos compostos nos osteoblastos de ratos Wistar. **A.** Viabilidade das rOB em exposição aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. **B.** Atividade da fosfatase alcalina do meio de cultura de rOB em exposição aos compostos sintetizados durante 14 dias de cultivo. **C.** Atividade da fosfatase alcalina contida nos rOB em exposição aos compostos sintetizados durante 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$.

Para verificar a atividade da ALP nos rOB frente às amostras, analisou-se qualitativamente a atividade da ALP por microfotografias do precipitado após 14 dias de cultura, foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 3). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras W17 e W31 após 14 dias apresentavam qualitativamente pouca atividade da ALP, as amostras W24, W32, W33, W35, W36 e W56 apresentavam qualitativamente moderada atividade da ALP e as amostras W30, W53 e W54 apresentavam-se qualitativamente semelhante aos controles (Figura 3). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

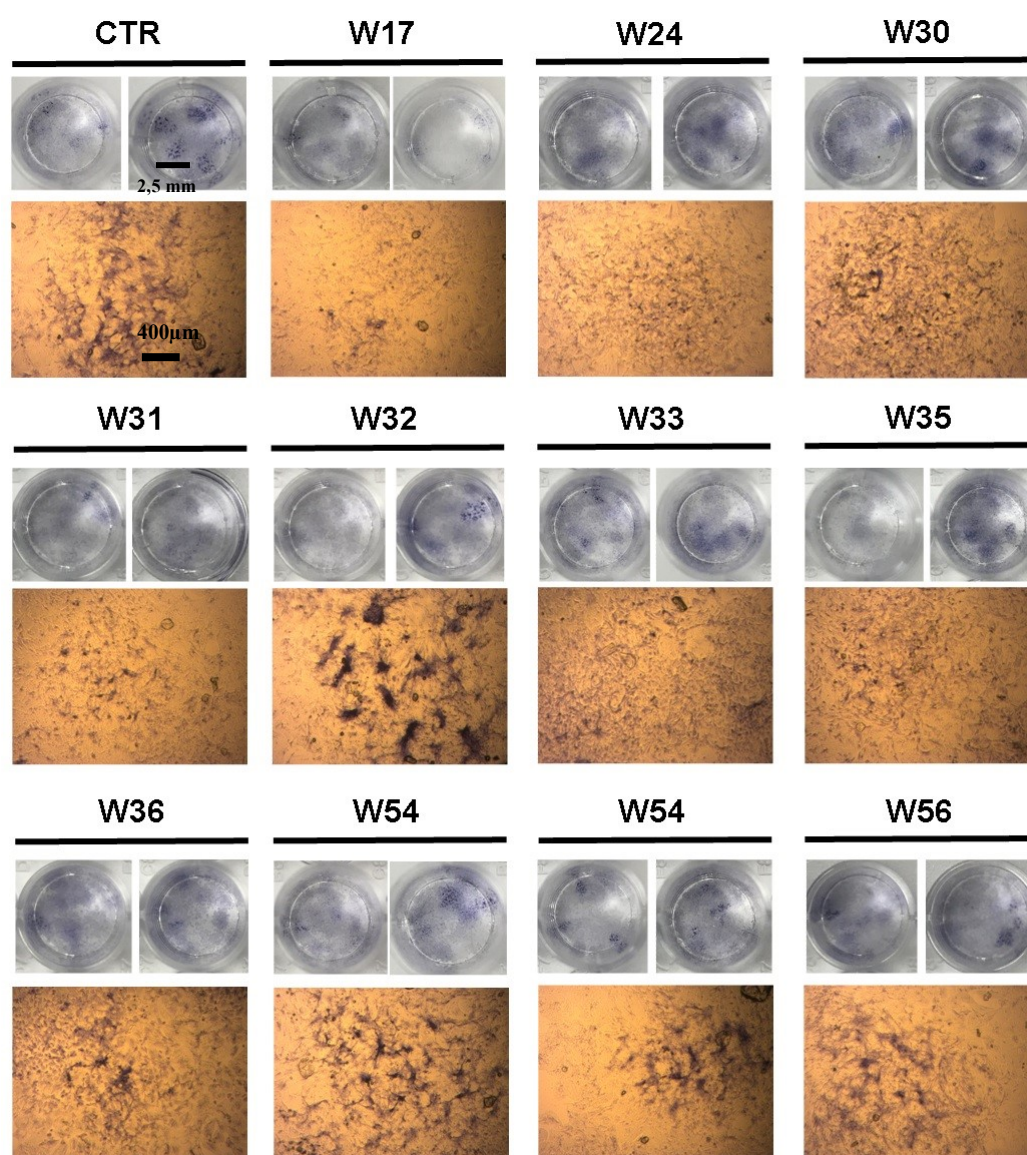


Figura 3. Fotomicrografia do precipitado resultado da atividade da fosfatase alcalina em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. A ALP metaboliza o reagente NBT/BCIP produzindo um precipitado roxo. O experimento foi realizado em duplicata. Aumento 100X.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da formação de nódulos de mineralização, as células foram coradas com *Alizarin Red S* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 4). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras W30, W35, W36 e W56 coraram pouco, às amostras W17, W24, W32, W53 e W54 coraram moderadamente e as amostras W31 e W33 apresentam elevada coloração quando comparados aos controles (Figura 4). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

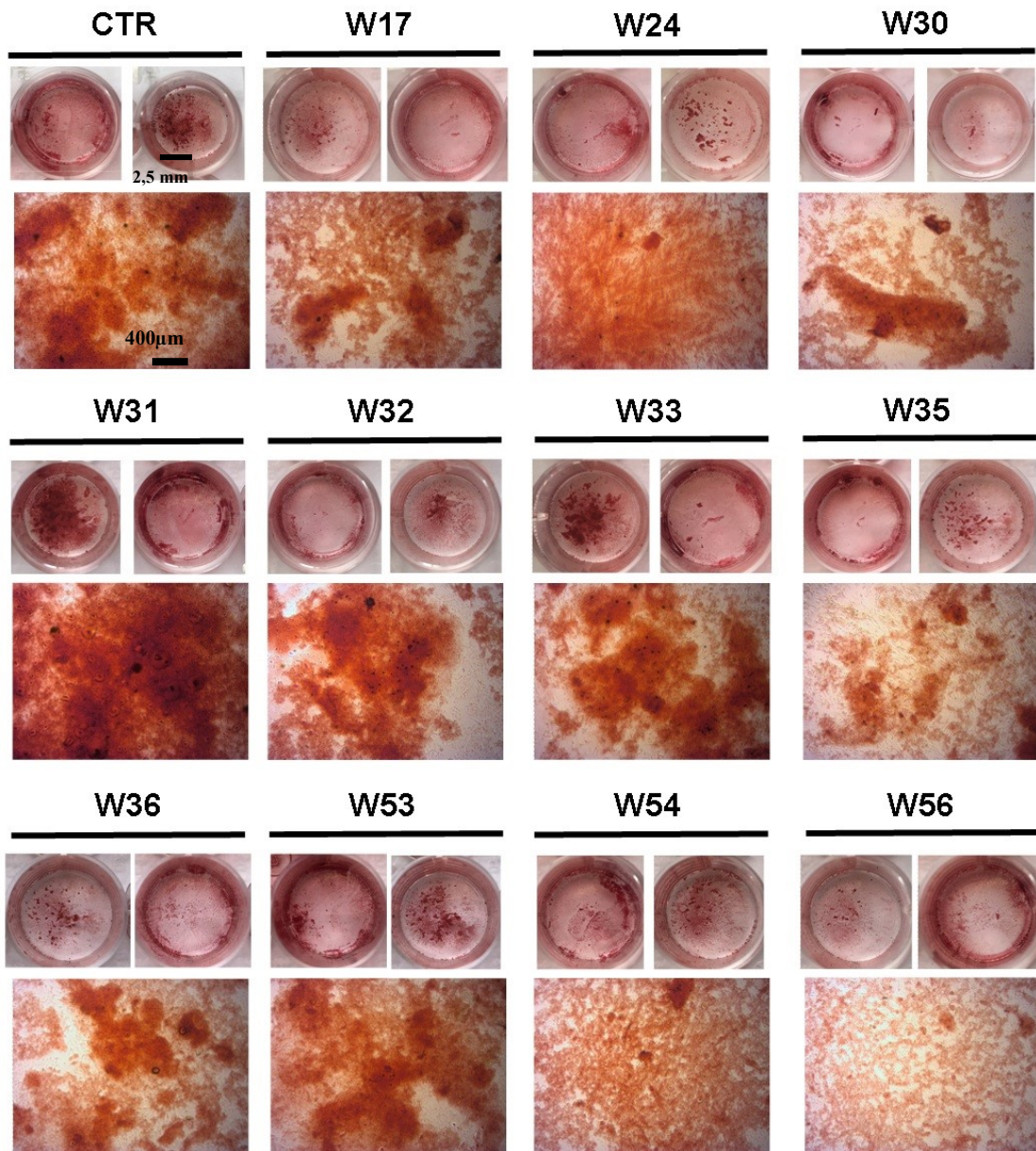


Figura 4. Fotomicrografia da coloração por Alizarin Red em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em vermelho e representam a formação de nódulos de mineralização. Aumento 40X.

Para verificar a maturação dos rOB por avaliação da deposição de matriz orgânica, os rOB foram corados pelo reagente *sírius red* para verificar a produção de colágeno pelos rOB e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 5). Foi observado que os osteoblastos expostos às W17, W33, W53 e W56 obtiveram coloração qualitativamente moderada, enquanto as demais amostras coraram qualitativamente pouco (Figura 5). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6.

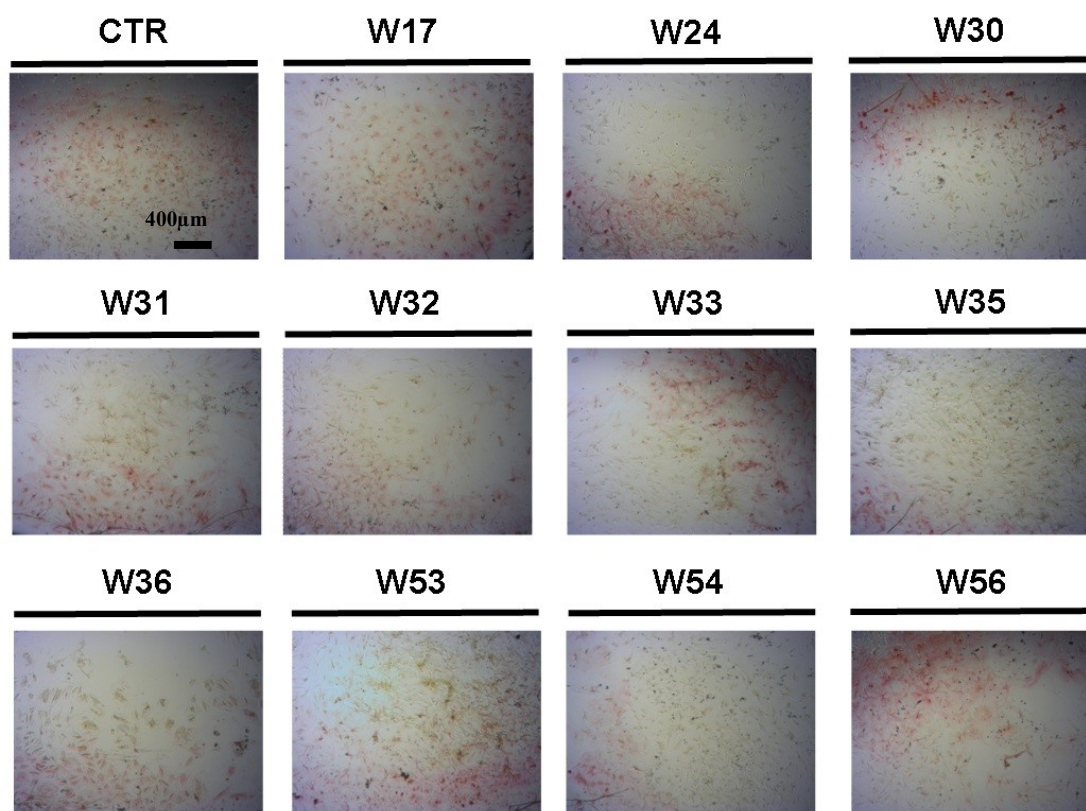


Figura 5. Fotomicrografia da deposição de colágeno em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. O colágeno depositado pelos rOB coram-se em vermelho/rosa. Barra de escala: 200µm

As análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação dos rOB foram resumidas na abaixo (Tabela 6).

Tabela 6. Score das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de rOBs.

Amostras	Coloração - Score		
	ALP	<i>Alizarin Red S</i>	<i>Sírius Red</i>
17	++	+++	+++
24	+++	+++	++
30	++++	++	++
31	++	++++	++
32	+++	+++	++
33	+++	++++	+++
35	+++	++	++
36	+++	++	++
53	++++	+++	+++
54	++++	+++	++
56	+++	++	+++
CTR	++++	++++	+++

Em conjunto, os dados indicam que nenhum dos compostos é prejudicial para a viabilidade e maturação de osteoblastos de ratos Wistar e, portanto, todos eles foram considerados compostos promissores para os demais ensaios. Assim como no capítulo anterior, os ensaios da atividade antiosteoclastogênica foram realizados em HSC de camundongos C57/bl6. Sendo assim, o próximo passo foi avaliar a viabilidade e maturação celular dos osteoblastos extraídos da calvária de camundongos C57/bl6.

4.3. Potencial osteogênico das moléculas nos osteoblastos de camundongos C57/bl6 (mOB)

A viabilidade dos mOB foi verificada após 3, 7 e 14 dias de cultivo. Não foram encontradas diferenças significativas na viabilidade dos osteoblastos cultivados com os compostos quando comparada à viabilidade dos mOB controle, independente do período de cultivo (Figura 6).

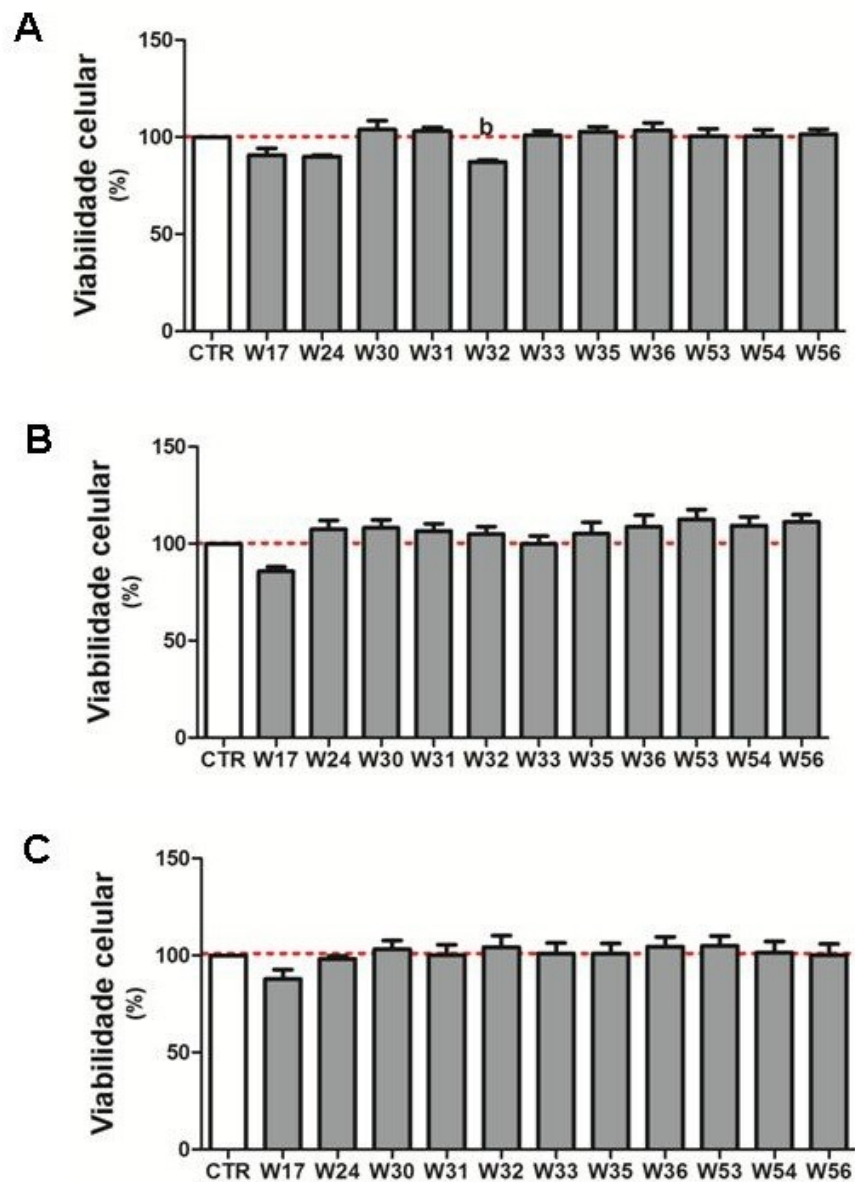


Figura 6. Viabilidade dos compostos em mOB durante A. 3 dias, B. 7 dias e C. 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. b: significativamente menor que o controle.

Após 3 dias de cultivo, não observamos diferenças significativas na atividade da ALP nos osteoblastos cultivados com os compostos quando comparados aos controles (Figura 7A). Em 7 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos W17 e W54 apresentaram maior atividade da ALP quando comparados aos controles (Figura 7B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com a amostra W24, W31, W35, W53, W54 e W56 apresentaram maior atividade da ALP quando comparados ao grupo controle (Figura 7C).

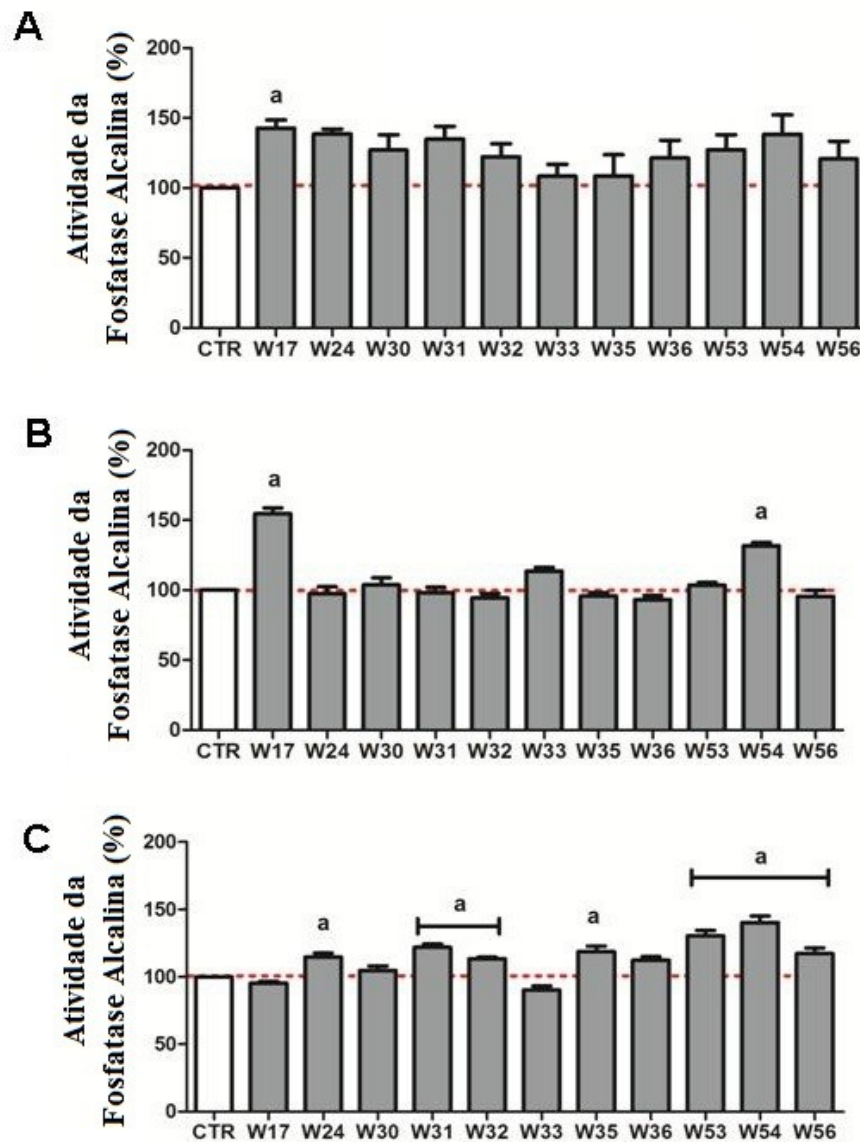


Figura 7. Atividade da fosfatase alcalina em mOB. Atividade da fosfatase alcalina em mOB em exposição aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias, **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle.

Para verificar a maturação dos mOB por avaliação da formação de nódulos de mineralização, as células foram coradas com *Alizarin Red S* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 8). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras W31, W32, W33, W36 e W56 coraram qualitativamente pouco, enquanto as demais obtiveram coloração qualitativamente moderada (Figura 8). As análises semiquantitativas foram resumidas na Tabela 6

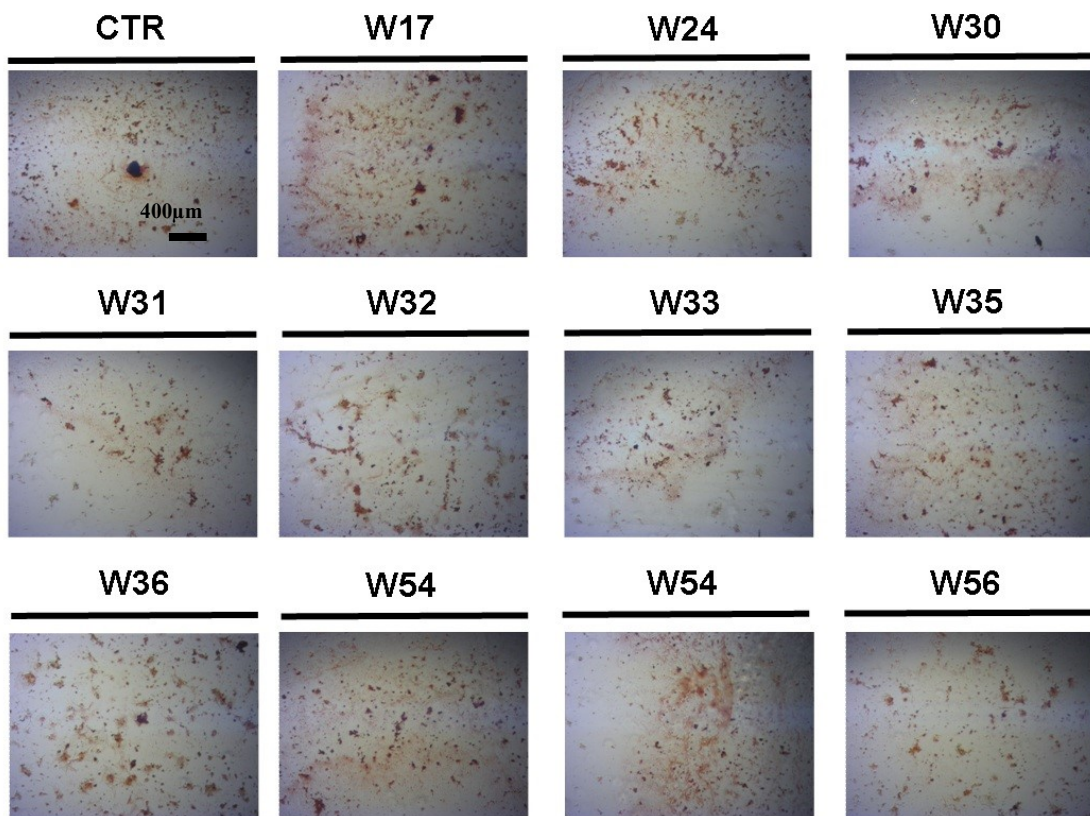


Figura 8. Fotomicrografia da coloração por *Alizarin Red S* em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em vermelho e representam a formação de nódulos de mineralização. Aumento 40X.

Para verificar a maturação dos mOB por avaliação da deposição de cálcio, os rOB foram corados pela coloração *Von Kossa* e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 9). Foi observado que todos os osteoblastos expostos às amostras W31 e W54 apresentavam coloração qualitativamente moderada, enquanto as demais amostras obtiveram coloração qualitativamente elevada (Figura 9).

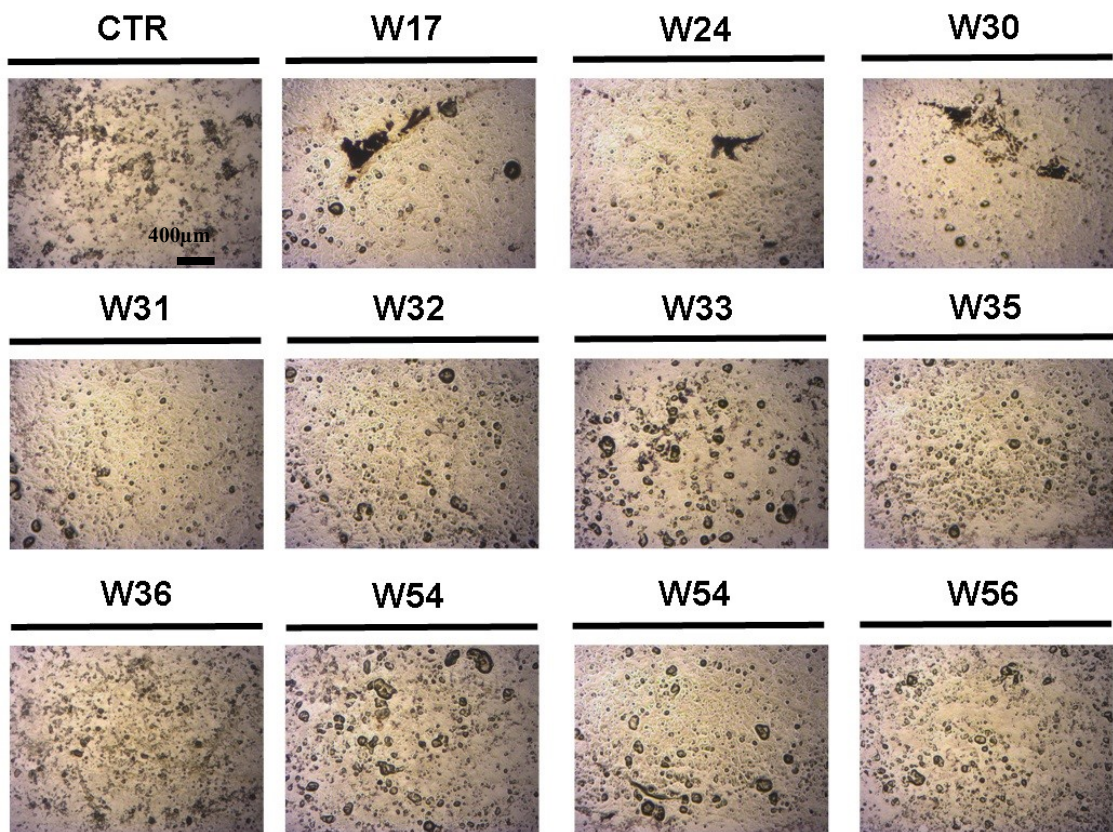


Figura 9. Fotomicrografia da coloração por *Von kossa* em rOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. Os depósitos de cálcio são corados em preto e é utilizada para quantificar a mineralização na cultura de células. Aumento 200X.

Para verificar a maturação dos mOB por avaliação da deposição de matriz orgânica, os mOB foram corados pelo reagente *sírius red* para verificar a produção de colágeno pelos mOB e as fotomicrografias foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 10). Foi observado qualitativamente que os osteoblastos expostos às amostras W17, W24, W31, W53 e W56 obtiveram coloração elevada, enquanto as demais obtiveram coloração qualitativamente moderada (Figura 10).

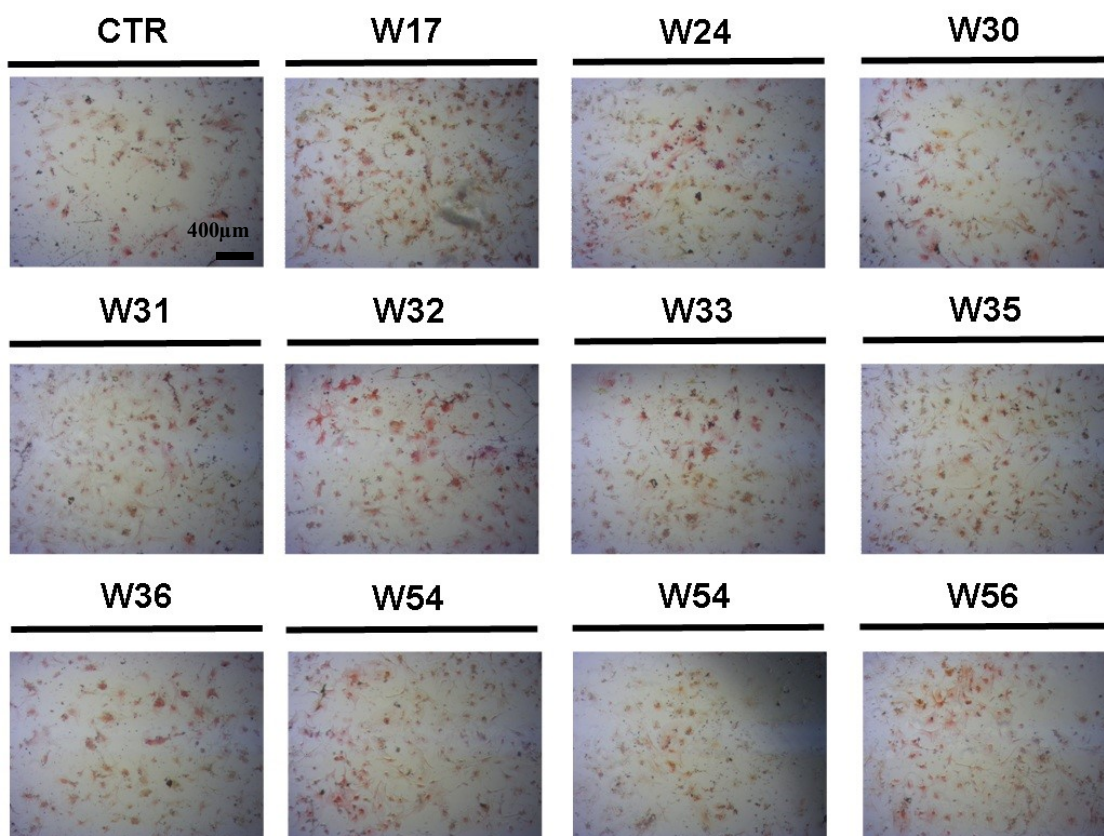


Figura 10. Fotomicrografia da deposição de colágeno em mOB expostos aos compostos sintetizados após 14 dias de cultivo. O colágeno depositado pelos mOB coram-se em vermelho/rosa. Barra de escala: 200µm

As análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação dos rOB foram resumidas na abaixo (Tabela 7).

Tabela 7. Score das análises semiquantitativas das colorações utilizadas para verificar a maturação de mOBs.

Amostras	Coloração - Score		
	<i>Alizarin Red S</i>	<i>Von Kossa</i>	<i>Sírius Red</i>
17	+++	++++	++++
24	+++	++++	++++
30	+++	++++	+++
31	++	+++	++++
32	++	++++	+++
33	++	++++	+++
35	+++	++++	+++
36	++	++++	+++
53	+++	++++	+++
54	+++	+++	++++
56	++	++++	++++
CTR	+++	++++	+++

Para verificar a maturação dos mOB por avaliação da síntese de matriz orgânica, a produção de colágeno pelos mOB foi quantificada (Figura 11). Após 3 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos W36 apresentaram maior produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 11A). Os osteoblastos cultivados com os compostos W17 apresentaram menor produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 11A). Em 7 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados com os compostos W24 e W31 apresentaram maior produção de colágeno comparados aos controles (Figura 11B). Após 14 dias, os osteoblastos cultivados com os compostos W24, W31, W32, W35 e W56 apresentaram maior produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 11C). Os osteoblastos cultivados com os compostos W17, W33, W36, W53 e W54 apresentaram menor produção de colágeno quando comparados aos controles (Figura 11C).

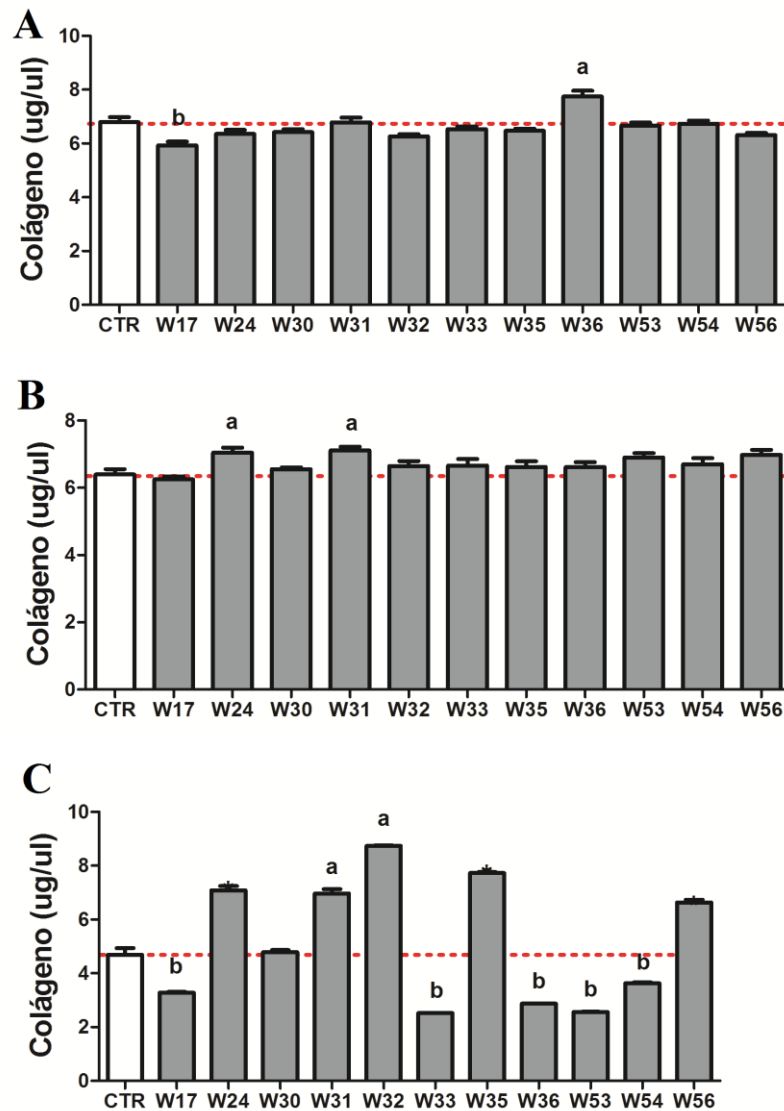


Figura 11. Produção de colágeno pelos mOB. Produção de colágeno pelos mOB expostos aos compostos sintetizados durante **A.** 3 dias; **B.** 7 dias e **C.** 14 dias. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. a: significativamente maior que o controle; b: significativamente menor que o controle.

4.4. Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas nos precursores de osteoclastos de camundongos C57/bl6

Após a seleção das moléculas com as células rOB, hASC e mOB, foi avaliado o potencial osteogênico dessas moléculas durante a diferenciação de células precursoras de osteoclastos. Primeiramente, os osteoclastos foram extraídos da medula óssea, de acordo com Marino *et. al* (16) e detalhado no capítulo anterior. Os precursores de osteoclastos foram cultivados com 25 ng/ml de m-CSF até atingirem a confluência de 95%.

Após a expansão dos precursores de osteoclastos, as células foram expostas em dois grupos: A) exposição das células a 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e os compostos

na concentração pré-estabelecida ou B) exposição das células a 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL, 10ng/ml de OPG e os compostos na concentração pré-estabelecida; sendo ambos grupos mantidos por 7 dias em cultura e a viabilidade e diferenciação avaliadas no 7º dia de cultura. Os grupos controles (CTR) receberam apenas meio DMEM suplementado acrescido de 25 ng/ml de m-CSF e 10 ng/ml de RANKL enquanto os controles OPG (CTR-OPG) receberam meio DMEM suplementado acrescido de 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e 10ng/ml de OPG (Figura 12A).

A fim de verificar o sucesso da diferenciação osteoclastogênica, as fotomicrografias por microscopia de contraste de fase foram capturadas pelo microscópio Evos FL (Life Technologies) e os osteoclastos foram contracolorados com DAPI para visualização dos núcleos (Figura 12A). Podemos observar nos controles (CTR) a presença de células grandes e multinucleadas (três núcleos ou mais) com diversas ramificações (setas pretas). Em contrapartida, os precursores que receberam a OPG apresentam células alongadas e menos de três núcleos por célula (Figura 12A). Ainda para verificar a eficiência da diferenciação osteoclastogênica, as células foram coradas por TRAP. Os osteoclastos foram corados em marsala destacado pela seta preta (Figura 12B). Concomitantemente, as células foram expostas ao substrato da fosfatase para verificar a atividade da fosfatase ácida tártaro-resistente (TRAP). O resultado final é um produto solúvel de coloração amarela e pode ser lido espectrofotometricamente a 405 nm (Figura 12B).

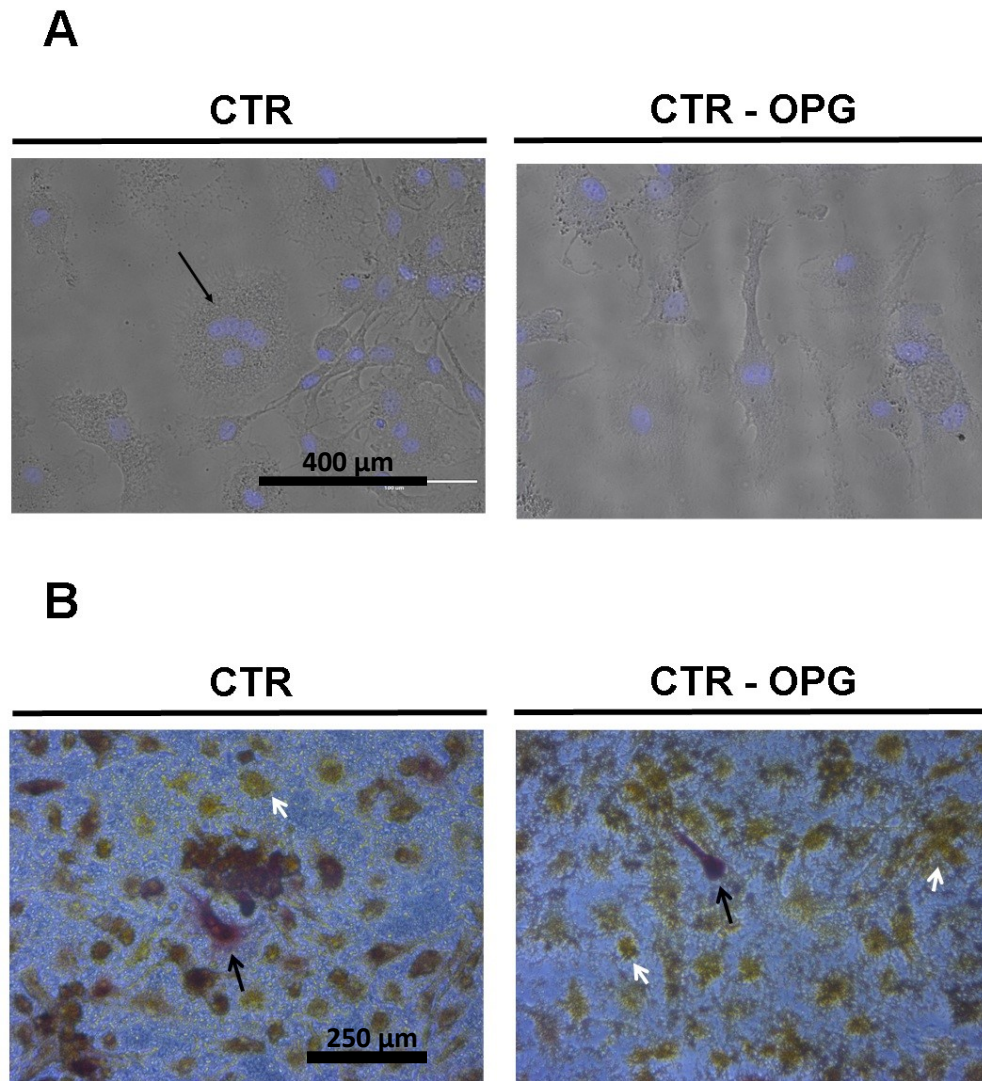


Figura 12. Cultura de osteoclastos. **A.** Imagens dos osteoclastos em microscopia de contraste de fase contracolorados com DAPI. **B.** Coloração por TRAP (em marsala destacado pela seta preta) e coloração da atividade da fosfatase (em amarelo destacado pela seta branca). Barra de escala: 100 μ m.

Nossos dados de viabilidade mostram que os osteoclastos e seus precursores cultivados com o composto W17 obtiveram maior viabilidade quando comparados aos controles. Em contrapartida, os compostos W36, W53 e W54 causaram uma diminuição na viabilidade dos osteoclastos e seus precursores quando comparados ao grupo controle (CTR). Os demais compostos não afetaram a viabilidade dos osteoclastos e seus precursores (Figura 13).

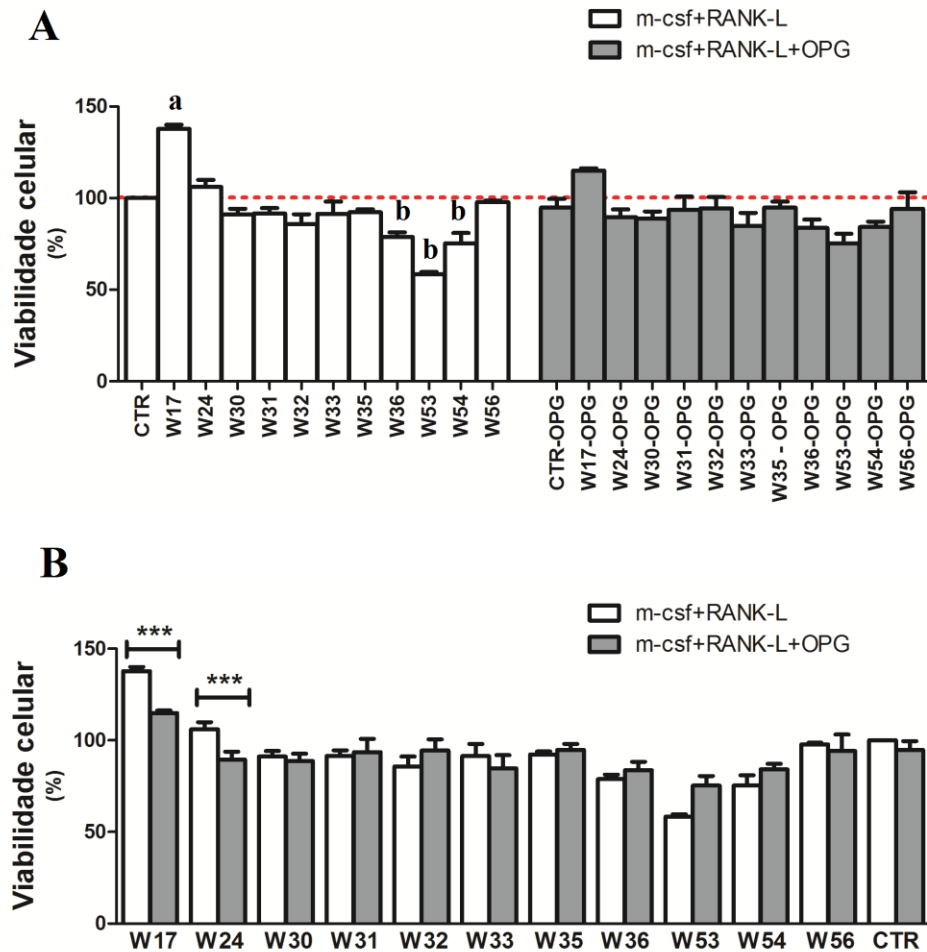


Figura 13. Viabilidade dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente maior que os controle. b: significativamente menor que o controle.

Nossos dados de atividade da fosfatase ácida mostram que os osteoclastos e seus precursores cultivados com os compostos W30, W35 e W56 obtiveram menor atividade da fosfatase ácida quando comparados aos controles. Quando cultivados em conjunto com a OPG e o composto W32, os osteoclastos e seus precursores apresentaram menor atividade da fosfatase ácida quando comparados ao grupo controle-osteoprotegerina (CTR-OPG) (Figura 14).

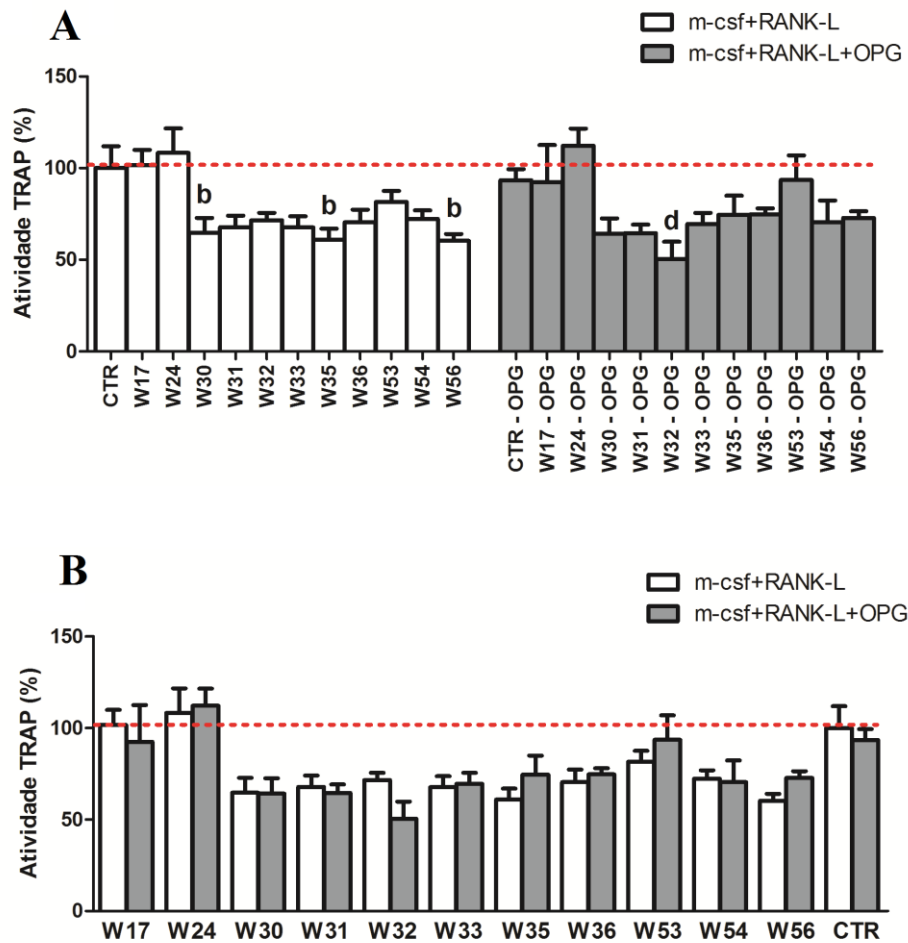


Figura 14. Atividade da fosfatase ácida târtaro-resistente em osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente maior que os controle. b: significativamente menor que o controle.

Em seguida, os osteoclastos foram corados por TRAP (coloração em marsala) concomitantemente à exposição ao substrato da fosfatase para verificar a atividade da TRAP (coloração amarela) (Figura 15).

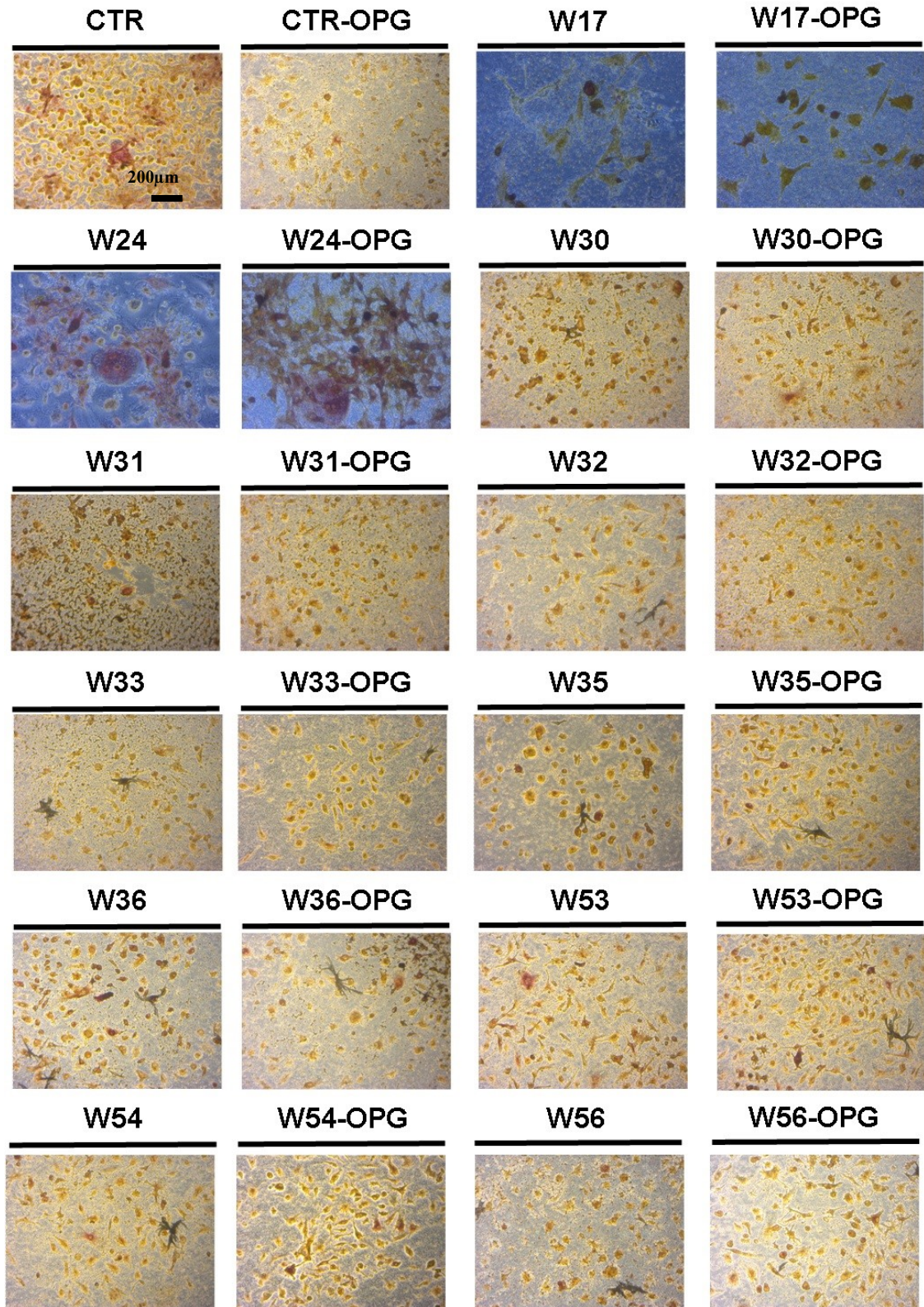


Figura 15. Coloração por TRAP dos osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. Coloração da TRAP em marsala. A atividade da fosfatase ácida produz um precipitado solúvel amarelo. Aumento: 100x

4.5 Potencial anti-osteoclastogênico das moléculas em cocultura de osteoclastos e osteoblastos de camundongos C57bl/6 (mOB)

1×10^3 osteoblastos de camundongos C57bl/6 foram cultivados em cocultura com 1×10^3 osteoclastos de camundongos C57bl/6 e após 7 dias de exposição à 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL e os compostos na concentração pré-estabelecida ou 25 ng/ml de m-CSF, 10 ng/ml de RANKL, 10ng/ml de OPG e os compostos na concentração pré-estabelecida a viabilidade das células foi quantificada (figura 16). Após 7 dias de cultivo, nós observamos uma menor viabilidade dos osteoclastos cultivados em co-cultura com os osteoblastos expostos aos compostos W17, W31, W33 e W53 quando comparados aos grupo controle (Figura 16). Os osteoclastos cultivados em co-cultura os osteoblastos expostos aos compostos W17, W31, W33 e W53 apresentaram menor viabilidade celular quando comparados aos seus pares W17-OPG, W31-OPG, W33-OPG e W53-OPG (Figura 16).

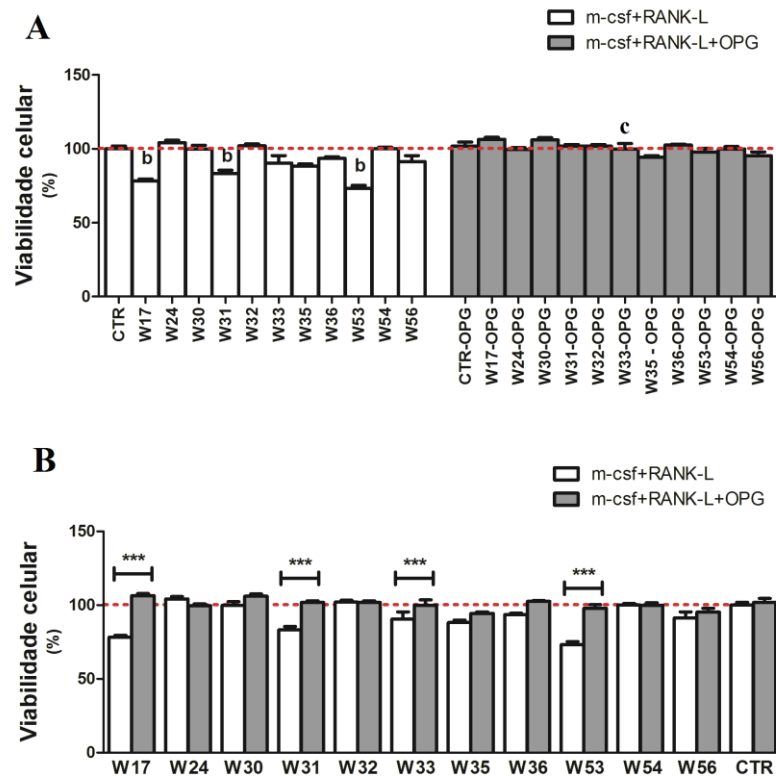


Figura 16. Viabilidade dos osteoclastos em co-cultura com os mOB após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente maior que os controle. b: significativamente menor que o controle.

Após 7 dias de cultivo, a atividade da ALP dos osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos foi quantificada (Figura 17). Foi observada uma maior produção de ALP pelos osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos e expostos aos compostos W17, W31 e W53 quando comparados aos grupos controle. Estes mesmos grupos apresentaram maior atividade da ALP quando comparados aos seus pares W17-OPG, W31-OPG e W53-OPG, respectivamente. Apenas os osteoblastos expostos ao composto W33-OPG apresentaram diferenças significativas na atividade da fosfatase alcalina quando comparados aos controles-OPG (Figura 17).

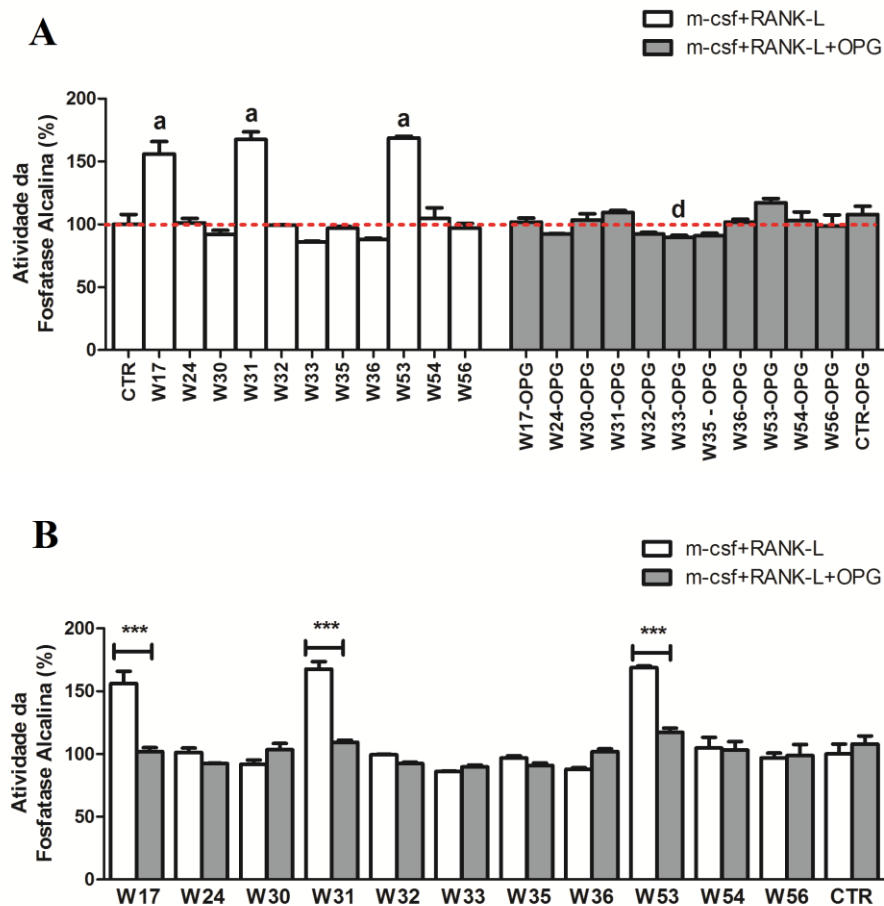


Figura 17. Atividade da fosfatase alcalina dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. **A.** Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente maior que os controle. b: significativamente menor que o controle.

Após 7 dias de cultivo, a produção de colágeno pelos osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos foi quantificada (Figura 18). Foi observada uma maior produção de colágeno pelos osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos e expostos aos

compostos W31 e W54 quando comparados aos grupos controle. Os osteoblastos cultivados em co-cultura com os osteoclastos e expostos aos compostos W17, W31, W33 e W53 apresentaram menor produção de colágeno quando comparados aos grupos controle. Quando comparados aos controles-OPG apenas os osteoblastos expostos ao composto W54-OPG apresentaram maior produção de colágeno. Os osteoblastos expostos aos compostos W17-OPG, W24-OPG, W31-OPG, W33-OPG, W35-OPG e W53-OPG apresentaram menor produção de colágeno quando comparados aos controles-OPG. A produção de colágeno pelos osteoblastos expostos aos compostos W17, W24, W31, W32, W35, W36 e W53 foi significativamente diferente quando comparados aos seus pares W17-OPG, W24-OPG, W31-OPG, W32-OPG, W35-OPG, W36-OPG e W53-OPG (Figura 18).

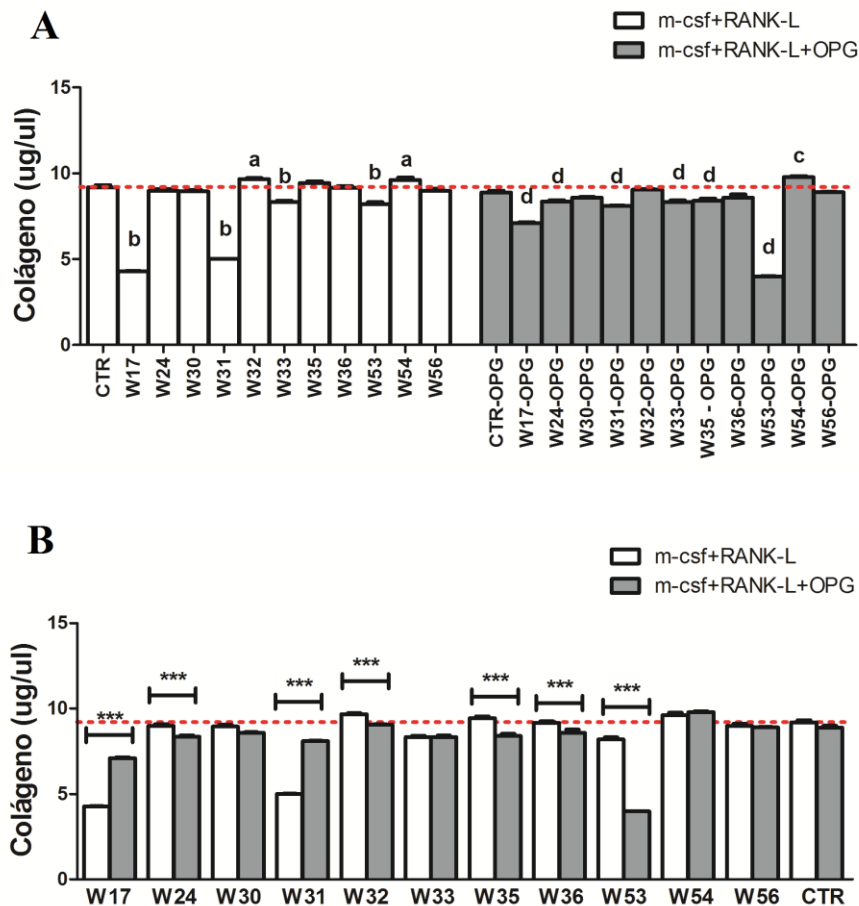


Figura 18. Produção de colágeno pelos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos. A. Comparação com os controles. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$ **B.** Comparação entre as células expostas a mesma amostra. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. a: significativamente maior que os controle. b: significativamente menor que o controle.

Após 7 dias de cultivo, a co-cultura foi fixada e as células foram coradas pela coloração Alizarin Red para visualizar deposição de cálcio. As amostras W54 e W56 juntamente com seus pares que receberam a OPG coraram fracamente pela alizarina, demonstrando menor deposição de cálcio (figura 19). As amostras W17, W24, W30, W32, W33 e W35 apresentaram vários pontos e regiões coradas positivamente, mas com menor intensidade quando comparadas aos controles (figura 19).

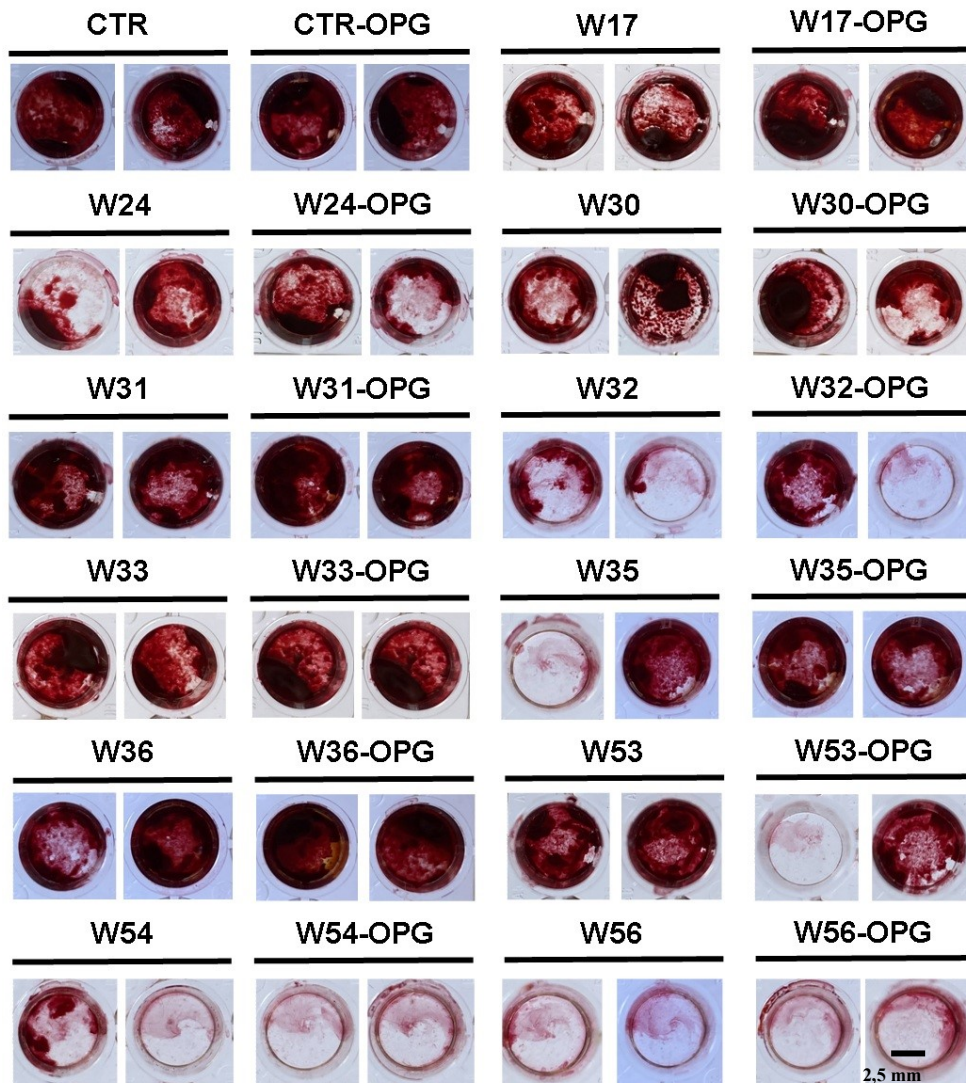


Figura 19. Coloração por *Alizarin Red* dos mOB em co-cultura com os osteoclastos após 7 dias de exposição aos compostos.

Em conjunto, nossos dados indicam que dentre os 16 compostos avaliados, os compostos W17, W31, W36 e W53 se apresentaram como moléculas promissoras para o tratamento da osteoporose.

5. Discussão

Entre as terapias anti-reabsortivas em uso, a mais utilizada são os amino bifosfonatos (11). Os BFs se ligam aos minerais ósseos, com o uso contínuo se acumulam nos ossos, o que eleva à meia-vida deste fármaco e não há estudos que comprovem a sua segurança em longo prazo. Dito isso, recentes estudos têm focado na produção de inibidores não bifosfonatos para o tratamento da osteoporose (11). Estudos *in vitro* demonstram o alto potencial anti-osteoclastogênico de ácidos graxos saturados C14-18 (11, 16), sendo a inibição da osteoclastogênese semelhante à inibição causada pela OPG. Sugere-se que os ácidos graxos saturados e suas variantes se ligam ao receptor de superfície celular GPR120 e essa ligação seja a responsável por inibir a osteoclastogênese (11, 16). Novas moléculas de 1,2,3-triazol demonstraram atividade inibitória na osteoclastogênese, dose dependente, induzida por TNFSF11 em células RAW 264,7. O híbrido 1,2,3-triazol inibiu consideravelmente a fosforilação de NF-κB (17-19).

Para o presente trabalho, foram desenvolvidos 16 derivados 1,2,3-bis-triazólicos-1,4-dissubstituídos contendo diferentes espaçadores. Nossos primeiros experimentos objetivaram estabelecer a dose ideal de cada composto em cada tipo celular além de promover uma rápida seleção de moléculas promissoras e viáveis em células de origem osteoblástica (rOB e mOB) e células com potencial para se tornarem osteócitos maduros (hASC) (Tabelas 1-4). É necessário que os novos fármacos produzidos para o tratamento da osteoporose atuem nos osteoblastos promovendo a sua atividade e proliferação enquanto nos osteoclastos atuam promovendo a inibição da sua atividade ou morte celular (4). Nesse primeiro experimento, nossos dados mostraram que os compostos não interferem na viabilidade de rOB e nas hASC, entretanto, nos mOB os compostos W34, W53, W64, W70 e W82 demonstraram-se citotóxicos e, por isso, foram excluídos do nosso trabalho (Tabela 1-3). Dados mostram que há diferenças entre as cepas e gêneros animais quando se trata de estudos de metabolismo de drogas (20). Sendo assim, é importante testar a viabilidade e os efeitos dos fármacos em diferentes tipos celulares visando à seleção dos melhores fármacos para estudos farmacocinéticos e toxicológicos *in vivo* (20). É importante lembrar que os ensaios pré-clínicos de novos medicamentos são comumente realizados em animais projetando o comportamento metabólico desses fármacos em humanos (21). Ao utilizar as hASC nos ensaios prévios, nós conseguimos realizar uma breve seleção dos compostos potencialmente não citotóxicos para humanos.

Depois de estabelecido as concentrações ideais para cada modelo celular, foi avaliada a influência dos compostos na viabilidade e atividade de pré-osteoblastos extraídos da calvária de ratos Wistar (rOB). Nossos dados demonstram que, neste modelo celular, todos os compostos são moléculas atrativas como tratamento para osteoporose já que elas não influenciam negativamente na viabilidade e atividade dos osteoclastos. Na homeostase esquelética, a reabsorção óssea osteoclástica e a formação óssea mediada por osteoblastos são equilibradas (22, 23). A fragilidade esquelética observada na osteoporose é resultado de um desequilíbrio na atividade relativa de osteoblastos e osteoclastos (24). As principais terapias aprovadas e disponíveis atualmente atuam inibindo a reabsorção óssea osteoclástica e não agem nos osteoblastos (25).

O próximo passo foi testar a eficiência e citotoxicidade dos compostos durante a maturação de osteoblastos de camundongos C57bl/6 e durante a osteoclastogênese de pré-osteoclastos de camundongos C57bl/6.

Os dados de viabilidade mostram que os compostos são viáveis em mOB (Figura 7). Entretanto, quando avaliamos a atividade da ALP, os compostos W17 e W54 apresentaram maior atividade da ALP aos 7 dias e após 14 dias, os compostos W24, W31, W35, W53, W54 e W56 apresentaram maior atividade da ALP (Figura 8). Em relação à concentração de colágeno, após 3 dias de cultivo, as amostras W17 e W36 foram significativamente maiores. Após 7 dias de cultivo, os compostos W24 e W31 apresentaram maior concentração de colágeno. Em 14 dias, as amostras W24 e W31 permaneceram com maior concentração de colágeno juntamente com as amostras W32, W35 e W56 enquanto as amostras W17, W33, W36, W53 e W54 apresentaram menor concentração de colágeno no meio de cultura (Figura 12). Em conjunto, esses dados indicam que os compostos W24, W31, W32, W35 e W56 são moléculas promissoras para o tratamento da osteoporose. Embora nenhum dos compostos seja considerado prejudicial para a viabilidade e atividade dos osteoblastos. O início da diferenciação osteoblástica é marcado pela elevada expressão dos genes RUNX2 e ALP (26). Durante a mineralização, a ALP é um dos primeiros genes a serem expressos e a síntese da ALP é extremamente importante para este processo. A ALP está diretamente relacionada a produção de hidroxiapatita, visto que ela é responsável pela hidrólise de PPi produzindo Pi (26, 27). Já no final do processo de mineralização óssea, a expressão de RUNX2 e ALP diminui enquanto a expressão e síntese de colágeno aumentam. A secreção de colágeno pelos osteoblastos, *in vivo*, formará o osteóide (26, 28).

Em seguida, foi testado a interferência dos compostos na viabilidade dos precursores de osteoclastos durante a osteoclastogênese (Figura 15). Nossos dados indicam que os compostos W17, W24, W36 e W54 aumentam a viabilidade dos osteoclastos enquanto o composto W53 diminuiu a viabilidade destas células. Em contrapartida, dentre esses compostos citados anteriormente, apenas as células expostas ao composto W36 apresentaram menor atividade da TRAP quando comparados aos controles. Além do W36, os compostos W30, W31, W32, W33, W35 e W56 também apresentaram menor atividade da TRAP. Em conjunto, os dados indicam os compostos W17, W31, W36 e W53 como um bom candidato ao tratamento da osteoporose visto que ele proporciona o aumento na viabilidade dos precursores de osteoclastos, mas inibe a sua atividade. Manter a viabilidade dos precursores de osteoclastos e dos próprios osteoclastos é extremamente importante para a homeostase óssea. Com sua atividade reduzida ou inibida, os osteoclastos são impedidos de desmineralizar o osso e agravar o quadro osteoporótico. Além disso, compostos melhoram a formação, atividade e maturação dos osteoblastos e, desta forma não há comprometimento do crosstalk entre osteoblastos e osteoclastos, na formação e maturação dos osteoblastos (29-31).

6. Conclusão

Sendo assim, com este trabalho podemos concluir que os compostos W17, W31, W36 e W53 são moléculas promissoras no tratamento da osteoporose com ação inibitória em osteoclastos e boa ativação osteoblástica. Ainda assim, novos ensaios são necessários para elucidar a interação entre os compostos produzidos e a catepsina K visando à aplicação *in vivo*.

7. Perspectivas

- ❖ Analisar os efeitos das moléculas selecionadas em hASC.
- ❖ Analisar as moléculas em ensaios de reabsorção.
- ❖ Análises da formação de anéis de f-actina em osteoclastos expostos as moléculas selecionadas, pelos ensaios de imunofluorescência.
- ❖ Analisar os efeitos das moléculas selecionadas em osteoclastos cultivados em matriz de colágeno tipo I.
- ❖ Testar os efeitos das moléculas promissoras *in vivo* em modelo animal hígido e osteoporótico.

8. Referências

1. Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. 2017;25(1):2.
2. Reszka AA, Rodan GA. Mechanism of action of bisphosphonates. *Current osteoporosis reports*. 2003;1(2):45-52.
3. van Beek E, Hoekstra M, van de Ruit M, Lowik C, Papapoulos S. Structural requirements for bisphosphonate actions in vitro. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1994;9(12):1875-82.
4. Masarachia P, Weinreb M, Balena R, Rodan GA. Comparison of the distribution of 3H-alendronate and 3H-etidronate in rat and mouse bones. *Bone*. 1996;19(3):281-90.
5. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. *Hormones*. 2009;8(2):96-110.
6. Bamias A, Kastritis E, Bamia C, Moulopoulos LA, Melakopoulos I, Bozas G, et al. Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(34):8580-7.
7. Edwards BJ, Gounder M, McKoy JM, Boyd I, Farrugia M, Migliorati C, et al. Pharmacovigilance and reporting oversight in US FDA fast-track process: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *The Lancet Oncology*. 2008;9(12):1166-72.
8. Marshall AJ, Lin JM, Grey A, Reid IR, Cornish J, Denny WA. Long-chain triazolyl acids as inhibitors of osteoclastogenesis. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2013;21(14):4112-9.
9. Viegas-Junior C, Danuello A, da Silva Bolzani V, Barreiro EJ, Fraga CA. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. *Current medicinal chemistry*. 2007;14(17):1829-52.
10. Hou J, Liu X, Shen J, Zhao G, Wang PG. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert opinion on drug discovery*. 2012;7(6):489-501.
11. Miszczyk P, Wieczorek D, Galezowska J, Dziuk B, Wietrzyk J, Chmielewska E. Reaction of 3-Amino-1,2,4-Triazole with Diethyl Phosphite and Triethyl Orthoformate: Acid-Base Properties and Antiosteoporotic Activities of the Products. *Molecules*. 2017;22(2).
12. Rucci N, Rufo A, Alamanou M, Capulli M, Del Fattore A, Ahrman E, et al. The glycosaminoglycan-binding domain of PRELP acts as a cell type-specific NF-kappaB inhibitor that impairs osteoclastogenesis. *The Journal of cell biology*. 2009;187(5):669-83.
13. Alvarenga EC, Rodrigues R, Caricati-Neto A, Silva-Filho FC, Paredes-Gamero EJ, Ferreira AT. Low-intensity pulsed ultrasound-dependent osteoblast proliferation occurs by via activation of the P2Y receptor: role of the P2Y1 receptor. *Bone*. 2010;46(2):355-62.
14. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
15. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Shakibaei M. Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochemistry and cell biology*. 2009;131(2):251-66
16. Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *BoneKEy reports*. 2014;3:570.
17. Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks: from OAF to Ephrin. *Inflammation & allergy drug targets*. 2012;11(3):196-200.
18. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).

19. Bernhardt A, Thieme S, Domaschke H, Springer A, Rosen-Wolff A, Gelinsky M. Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen--towards an in vitro model for bone remodeling. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;95(3):848-56.
20. Cornish J, MacGibbon A, Lin JM, Watson M, Callon KE, Tong PC, et al. Modulation of osteoclastogenesis by fatty acids. *Endocrinology*. 2008;149(11):5688-95.
21. Bozorov K, Zhao J, Aisa HA. 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2019;27(16):3511-31.
22. Park SK, Oh S, Shin HK, Kim SH, Ham J, Song JS, et al. Synthesis of substituted triazolyl curcumin mimics that inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2011;21(12):3573-7.
23. Rama Krishna B, Thummuri D, Naidu VGM, Ramakrishna S, Venkata Mallavadhani U. Synthesis of some novel orcinol based coumarin triazole hybrids with capabilities to inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis through NF-kappaB signaling pathway. *Bioorganic chemistry*. 2018;78:94-102.
24. Wang W, Teresa M, Cai J, Zhang C, Wong S, Yan Z, et al. Comparative assessment for rat strain differences in metabolic profiles of 14 drugs in Wistar Han and Sprague Dawley hepatocytes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*. 2021;51(1):15-23.
25. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2006;2(6):875-94.
26. Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10169):364-76.
27. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
28. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(12).
29. Rosset EM, Bradshaw AD. SPARC/osteonectin in mineralized tissue. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2016;52-54:78-87.
30. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
31. Filgueira L. Osteoclast Differentiation and Function 2010.

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DE LIGAS DE TITÂNIO-NIÓBIO REVESTIDAS COM FOSFATO DE CÁLCIO EM OSTEOLASTOS E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

1. Revisão Bibliográfica

O reparo de fratura óssea requer um material com uma estrutura estável capaz de permitir o desenvolvimento de calosidades curativas. O constante aumento na população e na expectativa de vida propicia o aumento de lesões com fraturas, o que acaba por movimentar o mercado de implantes ortopédicos e ortodônticos. Segundo o site Fortune business insights, estima-se que o mercado global de implantes ortopédicos movimentará cerca de 46,5 bilhões de dólares até 2024 enquanto que o mercado de implantes dentários cresce cerca de 7,9% por ano e terá um valor de mercado de cerca de 8,1 milhões de dólares até 2024 (acessado em 02/03/2021). Os enxertos ósseos podem ser aplicados em diversas áreas, como oncologia, cirurgias de coluna vertebral e traumatologia o que aumenta ainda mais a demanda por biomateriais implantáveis.

Nos últimos dois séculos, a expectativa de vida aumentou em cerca de 30 anos ao mesmo tempo em que cresce o poder aquisitivo da população. Somados, esses dois fatores, expõem a população a danos no qual há a necessidade de investir em biomateriais melhores, mais seguros e mais duradouros. Biomateriais de boa qualidade além de reduzirem o risco de infecção também trazem benefícios muito maiores na qualidade de vida do paciente.

1.1. Biomateriais

Os biomateriais aplicados no reparo ósseo devem apoiar a diferenciação osteogênica, permitindo a fixação celular, proliferação e diferenciação. Devemos lembrar que os materiais implantados estão em contato direto com o tecido do paciente participando de diversos processos químicos, físicos ou biológicos.

1.1.1 Classificação dos biomateriais

Os biomateriais podem ser classificados por diversas formas. Hudecki et al. classifica os biomateriais simploriamente em biomateriais reabsorvíveis e os não reabsorvíveis (1, 2). Os biomateriais reabsorvíveis são aqueles que se desintegram e são absorvidos pelo organismo. No local do enxerto, o biomaterial é substituído por matriz extracelular tecido-específica. O biomaterial não reabsorvível se mantém íntegro durante todo o tempo de uso (1).

Ainda, os biomateriais podem ser classificados de acordo com suas interações biológicas com o organismo em tolerantes, inertes ou ativos. Os materiais biotolerantes são bem aceitos pelo organismo, mas não permitem o crescimento celular e tecidual em suas superfícies. Essa característica impede a fixação adequada da peça implantada, pois tecido fibroso cresce em seu envoltório e pode encapsular a peça (1). São os materiais da primeira geração, no qual o foco das pesquisas era produzir um material com respostas negativas mínimas. Dois exemplos bem conhecidos de materiais biotoleráveis são o ouro e o aço inoxidável (3).

Os materiais bioinertes também são bem aceitos pelo organismo e permitem que ocorra interação entre o organismo e o material. Os materiais bioinertes aplicados na recuperação óssea são capazes de promover a osteogênese e neoformação óssea. Um biomaterial bioinerte amplamente aplicado na odontologia é o titânio (1). As ligas de titânio começaram a ser usadas em 1980 e desde então reduziu drasticamente a probabilidade de rejeição de implantes ortopédicos sem comprometer a mecânica óssea (3). Os materiais bioativos são bem aceitos pelo organismo, permitem a adesão e o crescimento celular em sua superfície e efetuam ligações químicas entre o material e o organismo, induzindo trocas iônicas e o fortalecimento da interação. Entre esses materiais bioativos destacamos a hidroxiapatita sintética (1).

Referindo-se a funcionalidade dos biomateriais, os mais interessantes para o reparo ósseo são os materiais osteobiológicos. Esses materiais osteobiológicos podem ser classificados em osteoindutíveis, osteocondutores e osteopromotores. Os osteoindutores estimulam a diferenciação de células pluripotentes em células da linhagem osteogênica. Os materiais osteocondutores permitem e auxiliam a adesão e o crescimento das células osteogênicas. E, materiais osteopromotores, liberam fatores que aumentam a formação óssea indireta (4, 5). Geralmente, a biofunção do material vai depender do material no qual ele é composto e as condições do seu processamento.

A engenharia tecidual busca a produção de um material ideal para enxertos ósseos e implantes que mimetize o tecido ósseo, ou seja, um material que seja reabsorvido pelo organismo somente no final do processo de reparo, que seja bioativo, osteoindutível, osteocondutor e osteopromotor.

1.1.2 Propriedades mecânicas e físico-químicas

Os enxertos devem apresentar propriedades mecânicas semelhantes às do local no qual será posicionado de modo a fornecer funcionalidade imediata após a implantação. A rigidez e a topografia dos biomateriais são características importantes capazes de influenciar na diferenciação, maturação celular e nas atividades dos osteoprogenitores. Tratando-se dos enxertos ósseos, é necessário que os biomateriais tenham determinada rigidez, apesar dos enxertos macios se integrarem mais rapidamente aos tecidos dos hospedeiros comparados as estruturas rígidas (6). O biomaterial implantado não pode ser deformado, indentado ou penetrado em resposta a tensão (2).

Uma falha entre o implante e o osso, devido diferenças na resistência mecânica, cria espaço para crescimento de tecido cicatricial (tecido mole e fibroso) que acarretará no desprendimento da peça (2). O biomaterial implantado não pode sofrer deformações quando submetido a uma tensão. Se o módulo de elasticidade do implante for diferente do osso, ele pode sobrecarregar o osso adjacente e agravar a fratura. No osso, os estímulos mecânicos são percebidos pelos osteócitos que são responsáveis pela transdução desses sinais biofísicos em respostas biológicas específicas, como o remodelamento ósseo. As células mantêm uma comunicação interativa com o microambiente no qual está inserido (células e matriz extracelular), respondendo e emitindo sinais em uma relação bidirecional (6).

Outro fator importante que influi na resposta tecidual é a topografia do material, pois permite a transmissão de sinais mecânicos específicos que podem ser transduzidos diretamente pelas células circundantes no local implantado (no caso células do nicho ósseo), influenciando em processos biológicos como a adesão, orientação, organização do citoesqueleto e expressão gênica (6). Juntos, topografia e composição do biomaterial influenciam na forma celular, motilidade e polarização celular. Ao aderir ao substrato, a célula forma complexos pontos de adesão focal que irão influenciar diretamente a organização do citoesqueleto. As células exercem forças contráteis na superfície do material que estão aderidas e a resistência do material a essa força promove uma resposta celular conforme a complacência do material. Um material de superfície irregular, normalmente, inibe a formação de densas adesões focais, resultando em menor tensão no citoesqueleto, menor formação de fibras de estresse e uma reorganização do citoesqueleto que causará deformações nucleares, levando à alteração na expressão gênica. Dalby et al. demonstraram que padrões altamente ordenados da matriz inibem a osteogênese, enquanto pequenas irregularidades

(deformações de 50 nm) nesta matriz aumenta estatisticamente a expressão de genes osteo-específicos (7).

1.1.3 Biocompatibilidade

Independente da classificação e das características do biomaterial, este deve ser, obrigatoriamente, biocompatível. O biomaterial entrará em contato direto com o tecido e qualquer incompatibilidade pode gerar um processo inflamatório severo e posterior rejeição do material. Sendo assim, os biomateriais devem ser compatíveis com o sangue, não tóxicos, não-inflamatórios, não-pirogênicos, não-alérgicos e não-cancerígenos (1).

O biomaterial deve ser resistente ao desgaste em processos de fricção. O desgaste do biomaterial libera pequenas partículas do material que podem se acumular em outros tecidos e comprometer a saúde do indivíduo (8). Além disso, quando o biomaterial é projetado para ser reabsorvido pelo organismo, a biodegradação deve ser controlada e os produtos secundários não tóxicos. Produtos de degradação tóxicos podem prejudicar ou retardar a osteogênese local e ainda podem atuar sistemicamente em um local longe de onde foi instalado (3). Atualmente, o biomaterial mais utilizado na ortopedia e ortodontia é o titânio.

1.2 Titânio

O titânio é um metal de transição do grupo IV B, de número atômico 22 com massa atômica de 47,9 u e ponto de fusão de 1668°C. É o quinto metal em abundância na crosta terrestre e a forma mineral mais comum encontrada na natureza é a ilmenita (FeTiO_3), um minério extraído de areias aluviais e depósitos rochosos. O titânio pode ser encontrado na forma de dióxidos como rutilo (TiO_2 tetragonal), anastasio (TiO_2), broquita (TiO_2 ortorrômbico), entre outras formas como a perovskita (CaTiO_3), "sphene" (CaTiSiO_5), e geiquielita (MgTiO_3) (8).

O titânio na sua forma pura foi produzido pela primeira vez em 1910, a partir do aquecimento do tetracloreto de titânio e sódio. Este metal apresenta elevada resistência e baixa densidade, características que trazem elevado valor agregado e o torna um metal bastante promissor para fins estruturais com aplicações nas indústrias químicas e aeroespaciais e nas áreas biomédicas (5, 7, 8).

O titânio apresenta duas formas alotrópicas em condições de equilíbrio termodinâmico: a fase austenítica (fase α) de alta temperatura e a fase martensítica (fase β) de baixa temperatura e cada modificação somente é estável dentro de uma faixa de temperatura

específica. Em temperaturas baixas, o Ti puro possui uma microestrutura hexagonal compacta (HC), que também é conhecida por fase alfa (α). Em altas temperaturas (882,5°C) ocorre a transformação alotrópica do Ti- α em uma nova estrutura, agora com uma microestrutura cúbica de corpo centrado (CCC) e denominada de fase beta (β) (9, 10).

O titânio pode ser modificado formando ligas metálicas com outros elementos. A adição de outros elementos modifica a temperatura de transformação alotrópica das ligas e são conhecidos como α -estabilizadores (aumentam a temperatura de transformação alotrópica) e β -estabilizadores (diminuem a temperatura de transformação alotrópica) (9, 10). As propriedades das ligas são ditadas pelas características dos pós metálicos que formam aquela matriz juntamente com as partículas de retenção de espaço que são utilizadas como formadores de poros (11). Desta forma, os elementos das ligas devem ser selecionados sempre pensando na sua aplicação, função e os possíveis efeitos colaterais da liga. Elementos como o zircônio (Zr), nióbio (Nb) e tântalo (Ta) são considerados seguros para serem aplicados in vivo e na produção de ligas para serem aplicadas ao tecido ósseo (10, 12).

1.2.1 Ligas de Titânio

As ligas de titânio podem ser classificadas de acordo com sua microestrutura em quatro classes: ligas α , liga próximo de α (ligas near- α), ligas $\alpha+\beta$ e ligas β . As ligas α apresentam alta resistência a corrosão e a deformação. Podem ser encontradas em três formas: o titânio não ligado (Ti puro), as ligas α e as ligas quase- α . Estas ligas apresentam β -transus acima de 800°C, não permitindo a alteração da microestrutura com tratamentos térmicos. O Ti puro é composto apenas por grãos na fase α e apresenta elevada resistência a corrosão. As ligas- α ligadas recebem β -estabilizadores como o alumínio (Al), estanho (Sn), zircônio (Zr), nitrogênio (N) e oxigênio (O), que aumentam a dureza da liga enquanto que o vanádio (V) e molibdênio (Mo) são adicionadas as Ti- α após tratamento térmico (10, 13). Já as ligas quase- α são compostas por uma fase α primária incorporada em uma matriz de fase β lamelar. As ligas $\alpha + \beta$ permitem alteração da microestrutura por meio de tratamentos termomecânicos. Estas ligas apresentam retenção da fase β , pois possuem temperaturas de transição alotrópicas relativamente baixas (11, 13, 14). As ligas β são aquelas nas quais há a formação de uma fase β metaestável e não há transformação martensítica durante a diferença de temperatura (durante a têmpera) (11, 13).

A metalurgia do pó utiliza de duas técnicas principais para a produção de ligas em geral: a técnica pré-liga e a técnica *Blended Elemental*. Na técnica pré-liga, os elementos que

serão adicionados ao metal de base da liga são adicionados antes da liga ser atomizada na forma de pó. Os produtos desta técnica apresentam densidade semelhante às do metal fundido. Na técnica *Blended Elemental*, ocorre uma mistura dos pós metálicos puros. Os pós são misturados e prensados a frio, mecanicamente ou isostaticamente, pela pressão de um gás ou fluido, e a liga já é moldada na forma desejada. A liga é sintetizada à vácuo e apresenta uma densidade menor do que a densidade dos metais fundidos. É um processo barato e simples, e a temperatura de síntese é bem menor do que os pontos de fusão dos elementos que a constitui (10, 13).

A metalurgia do pó apresenta boas vantagens em relação as outras técnicas de produção de ligas metálicas como o baixo custo de produção, diminuição da temperatura na produção, versatilidade do método e inúmeras opções para a produção de amostras altamente porosas. Tanto na técnica de pré-liga e a técnica *Blended Elemental*, os pós metálicos podem ser misturados com partículas que prendem o espaço e podem ser removidas posteriormente. Isso garante a produção de amostras com porosidades de até 70%, com baixos custos e sem prejudicar a infraestrutura de fabricação e o processamento da liga (10).

1.2.2 Porosidade

Os biomateriais ósseos ideais mimetizam a estrutura interna do osso natural. Tratando-se da arquitetura 3D, o osso natural é poroso em seu interior, em diferentes escalas (desde microescala a nanoescala) permitindo o crescimento ideal das células e da arquitetura venular (4). Poros na escala micrométrica (150-800 μm) fornecem espaço para o transporte de nutrientes e metabólitos, permite o crescimento de novos vasos sanguíneos e formação de novo tecido ósseo. Ainda na escala micrométrica (10-100 μm) permite o crescimento de capilares dentro do biomaterial, mantendo a nutrição e as trocas de metabólitos das células no interior do biomaterial. Poros na escala nanométricas beneficiam a adesão celular e a adsorção de proteínas (4).

Portanto, a fim de imitar o microambiente da ECM, os biomateriais ósseos devem ter uma estrutura porosa em várias escalas. A porosidade do material tem uma relação direta com a biodegradabilidade do biomaterial. Os poros aumentam a superfície de contato dos biomateriais, ampliando a possibilidade de interação entre o biomaterial e as células neles cultivados ou na sua adjacência. Além disso, a porosidade do material possibilita a formação e migração de vasos sanguíneos, permitindo uma neoangiogênese no local implantado e a vascularização é vital para a consolidação óssea (3, 4).

Nas ligas de titânio, os poros podem ser formados por várias metodologias, dentre as quais podemos destacar a sintetização de pó, muito utilizada na metalurgia do pó. Nesta metodologia, as partículas de pó metálico, que formarão as ligas, são compactadas e sintetizadas. Os poros formados são resultado do arranjo de partículas de pó que formarão a matriz metálica e a forma dos poros dependerá dos tamanhos e da forma destas partículas de pó iniciais. Neste método, a porosidade máxima alcançável é limitada a 35%. É possível ainda, adicionar partículas temporárias nestes pós metálicos, durante a síntese, que atuaram como formadores de poros, em um método de suporte de espaço. Resumidamente, os formadores de poros são misturados e compactados juntamente com as partículas de pó metálico e são removidos antes ou durante a sinterização. O local onde anteriormente era preenchido pelas partículas inertes (formadores de pó) serão os poros novos formados na matriz metálica. A amônia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) e cloreto de sódio (NaCl) são exemplos de partículas inertes usadas como formadores de poros (5, 11).

1.2.3 Titânio-Nióbio

A produção de ligas de titânio tem ganhado cada vez mais destaque. Pesquisadores trabalham a fim de produzir uma liga com características ideais para aplicações biomédicas e neste contexto, as ligas de titânio-nióbio (Ti-Nb) tendem a crescer e receber cada vez mais investimentos. As ligas Ti-Nb combinam dois fatores importantes para o sucesso dos materiais na área biomédica: biocompatibilidade e propriedades mecânicas (15). Ambos os metais que compõem a liga são biocompatíveis e quando unidos, na forma de ligas Ti-Nb, apresentam módulo elástico correspondente aos do osso humano (8, 15).

As ligas de Ti-Nb são estáveis nas fases sólidas α (hexagonal compacta) ou β (cúbica de corpo centrado), contudo a fase sólida da liga será diretamente dependente da concentração de nióbio na liga. Ligas Ti-Nb com até 3 % em massa atômica de Nb apresentam-se estável à temperatura na fase α . À medida que aumentamos o teor de Nb na liga, maior a fração de fase β nas ligas. A adição de Nb torna as ligas estáveis na fase β em temperatura ambiente (8).

A concentração de Nb nas ligas de Ti está diretamente relacionada ao módulo de elasticidade da liga (3, 15). Baixas concentrações de Nb aproximam o módulo de elasticidade da liga ao módulo de elasticidade do Ti puro (110 GPa). Ligas de Ti-Nb com cerca de 15% de Nb na sua constituição apresentam módulo de elasticidade de cerca de 70 GPa (11).

1.2.4 Fosfato de cálcio como revestimento de biomateriais

Entre vários revestimentos de superfície, visando a osseointegração, a hidroxiapatita (HA), o fosfato de cálcio e β -fosfato tricálcico (β -TCP) recebem maior atenção. β -fosfato tricálcico (β -TCP) e HA são aplicados aos biomateriais para aumentar a sua rigidez. Ambos são capazes de modificar tanto a rigidez quanto a composição bioquímica do biomaterial que compõe (6). Durante o processo de biomineralização, grandes quantidades de fosfatos de cálcio são produzidas, cristalizadas e depositadas na matriz óssea. A principal forma mineral encontrada no organismo é a apatita biológica, que é uma apatita deficiente em hidroxila e rica em carbonato. Uma variedade de tipos de fosfato de cálcio pode ser encontrada no organismo, como os fosfatos de cálcio amorfos (ACP), fosfato octacálcio (OCP), tricálcio fosfato, hidroxiapatita e estes são classificados através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo (razão Ca/P). Nos ossos, a hidroxiapatita representa cerca de 70% do tecido ósseo e a razão Ca/P é de 1,67 (5, 16). A solubilidade do material é de extrema importância na aplicação como biomaterial e de forma geral, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade do fosfato de cálcio.

Modificações na micro/nano topografia do biomaterial são suficientes para influenciar a hidrofília da superfície, auxiliando a adsorção de proteínas e adesão celular. Pensando nestes benefícios e na produção de um biomaterial de excelência, diversas técnicas com a capacidade de modificar as superfícies (internas e externas) dos materiais foram aprimoradas, como a deposição eletroforética, deposição química, deposição de vapor e automontagem (5). Essas técnicas focam no melhoramento da superfície dos materiais com substâncias osteocondutoras e osteoindutoras visando melhorar a osseointegração da superfície do titânio bio-inerte. Modificações na composição química da superfície influenciam diretamente a diferenciação celular e a osteogênese de contato (5).

O método de revestimento biomimético é uma técnica altamente promissora, com um processo simples e barato que merece destaque. Resumidamente, a técnica se baseia na imersão de substratos metálicos em uma solução de fluido corporal simulado mantida a um pH fisiológico e a 37 ° C por um período prolongado. Com o decorrer do tempo, fases de CaP precipitam nas ligas de forma homogênea. A solução utilizada é composta por concentração de íons que imita a concentração iônica do plasma humano, podendo ser utilizado tampões como o PBS e o HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*). Esta técnica permite a formação de hidroxiapatita carbonatada *in vitro* semelhante à HA do osso. Fosfatos de cálcio podem ser

sintetizados por precipitação a partir de soluções contendo íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Materiais metálicos necessitam de um pré-tratamento com soluções ácidas (HCl ou HF) ou com soluções alcalinas (NaOH) antes de passar pelo revestimento biomimético para ativar a superfície do substrato (17).

Quando mais similar ao microambiente ósseo melhor serão os biomateriais, pois assim eles são capazes de fornecer um ambiente para que os osteoblastos se mantenham funcionais. Um microambiente que permite o crescimento e a manutenção de células ósseas funcionais é crucial para os estágios iniciais de cicatrização de fraturas ósseas e o início da formação de osso novo. Nosso trabalho demonstra notável relevância, visto ser o primeiro na literatura a comparar o potencial osteogênico de ligas metálicas com diferentes porosidades de Ti35Nb formadas pela metalurgia do pó e revestidas com fosfato de cálcio pelo método biomimético, utilizando duas culturas celulares primárias diferentes. Dito isso, é emergente o desenvolvimento de biomateriais resistentes, baratos e biocompatíveis para o reparo de fraturas ósseas.

2. Objetivo

2.1 Geral

Avaliar a citocompatibilidade de ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio em osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citocompatibilidade das ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio rOB e hASC;
- Avaliar a maturação de rOB sobre as ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio
- Avaliar o potencial osteogênico das ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio

3. Materiais e Métodos

3.1 Ligas de Titânio-Nióbio revestidas com fosfato de cálcio

As ligas de titânio-nióbio foram cedidas pela Professora Dra. Roseli Marins Balestra, da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ). As ligas foram produzidas com

estruturas macro (CMA) e microporosa (CMI), produzida via metalurgia do pó e com revestimento de fosfato de cálcio (MA e MI), depositado pelo método biomimético, para aplicação como biomaterial (18).

Os materiais foram pesados em balança analítica *Shimadzu*, nas proporções de Ti (65 % em massa) e Nb (35 % em massa). As amostras Macroporosas receberam 30 % em massa de bicarbonato de Amônio (BA) para conferir a porosidade desejada. Em sequência as amostras CMA passaram por um tratamento térmico para eliminação do formador de poros BA, permitindo a formação da porosidade desejada. Desta forma, foram produzidas amostras da liga Ti35Nb, cilíndricas de 8 mm de diâmetro e 3,5 mm de altura com duas porosidades distintas e por isso denominadas de Microporosa e Macroporosa. Como procedimento final da produção das ligas, as amostras, tanto Micro quanto Macroporosas, foram sinterizadas em forno do tipo Astro da marca *Thermal Technology*, sob uma atmosfera de argônio e temperatura de 1300 °C por 2 h, sendo o aquecimento a 10 °C/min e resfriamento natural até a temperatura ambiente dentro do forno. Com as imagens obtidas via MEV (**Figuras 1**) foi possível verificar a morfologia dos grãos e dos poros das ligas, assim como a microestrutura formada no processo de síntese. Ambas as ligas possuem microporos, característicos do processo de metalurgia do pó e de grande relevância para uma melhor adesão implante-osso. Para a liga CMI os poros são da ordem de 15,98 μm ($\pm 11,63$), já para a liga CMA estes microporos são da ordem de 14,44 μm ($\pm 10,29$). Além de microporos, a liga CMA possui macroporos da ordem de 285,22 μm ($\pm 195,54$), que são produzidos graças a adição do formador de poros, BA (18).

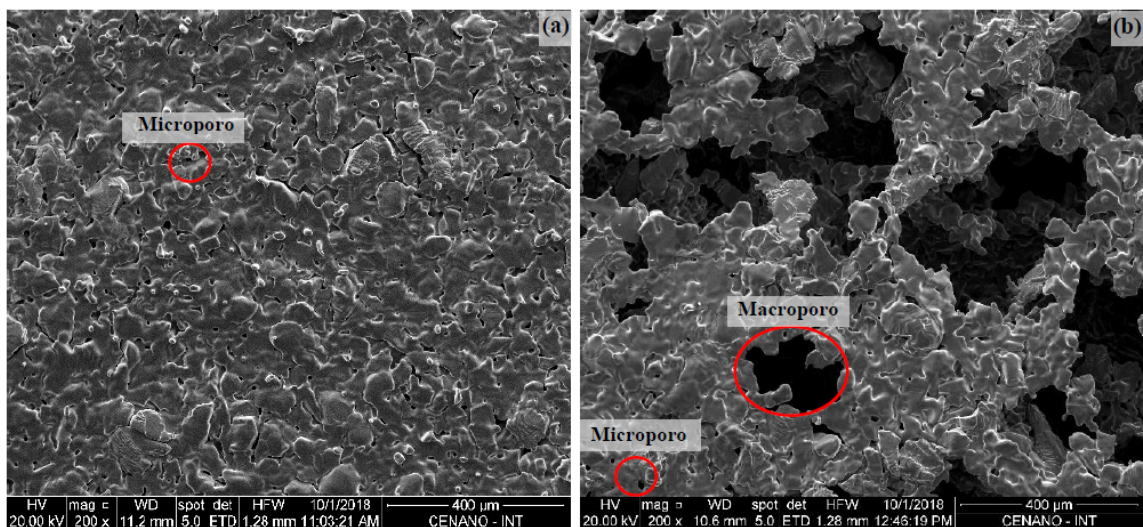


Figura 1. Microestrutura das ligas com uma amplificação de 200x (a) Microporosa (CMI); (b) Macroporosa (CMA). Foto: *Goulart, F.F. et al (2020)*.

Após o processo de síntese das amostras, as mesmas foram lavadas em uma sequência de banhos ultrassônicos, em sabão neutro, álcool etílico, acetona e água destilada e em seguida secas em estufa a 60 °C por no mínimo 1 h. Em seguida, as amostras passaram por um tratamento químico com NaOH 1M em autoclave a 130 °C por 24 h, seguido de um tratamento térmico por 1 h a 200 °C. A seguir temos imagens (**Figura 2**) da superfície de amostras Micro e Macroporosas tratadas química e termicamente (pós TQT). Em ambas é possível verificar uma modificação na textura da superfície, quando comparadas com as ligas antes do TQT (**Figura 1**). Podemos observar nas imagens de MEV a presença de partículas brancas espalhadas de forma aleatória, algumas em forma lamelar e outras em formas arredondadas, sendo ambas associadas à formação de uma camada de Titanato de sódio (**Figura 2**) (18).

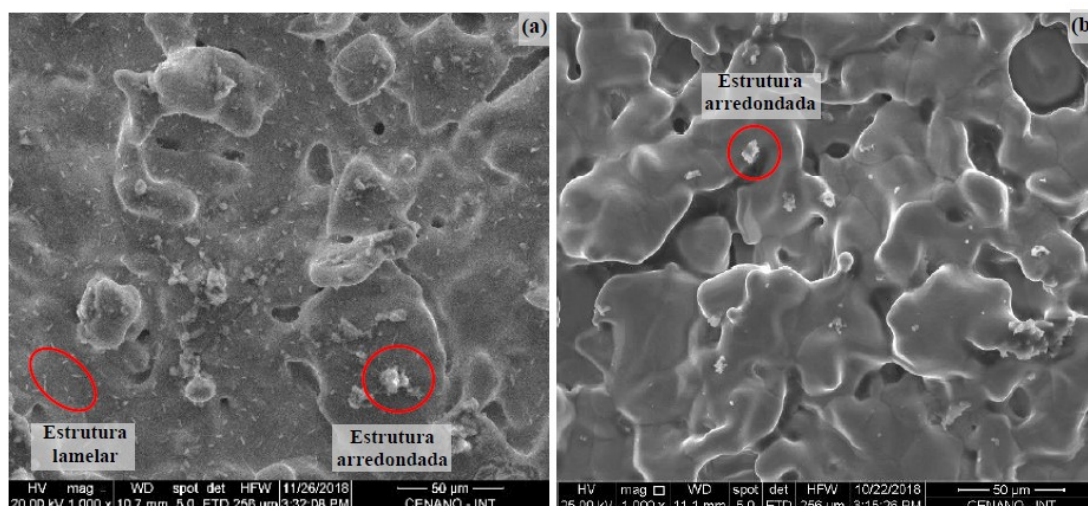


Figura 2. Microestruturas das ligas após o TQT com uma amplificação de 1.000x. **(a)** Microporosa (MI_TQT); **(b)** Macroporosa (MA_TQT). Foto: *Goulart, F.F. et al* (2020).

Como etapa subsequente, foi realizado o processo biomimético de deposição de revestimento de fosfato de cálcio (CaP). Para isso, foi preparado uma Solução Simplificada (SS) de 2,5 Mm de cloreto de cálcio dihidratado e o 2,0 Mm de fosfato dissódico dihidratado, em água destilada (19). As amostras MI e MA foram imersas na SS durante 21 dias, a 37 °C, sendo que a solução foi renovada a cada 2 dias. Após 21 dias, as amostras foram drenadas e cuidadosamente lavadas com água destilada, para remoção do excesso de SS. Em seguida, foram secas a 37 °C em estufa por 12 horas. Imagens de MEV demonstram pontos e aglomerados brancos distribuídos de forma aleatória pelas amostras, inclusive nos poros. Além disto, as texturas das superfícies se tornam diferentes das encontradas anteriormente ao processo de deposição do revestimento (18).

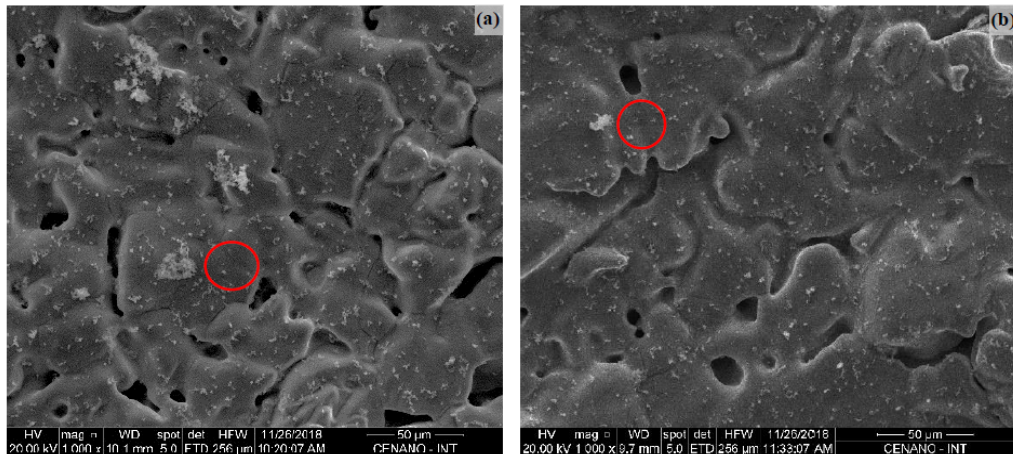
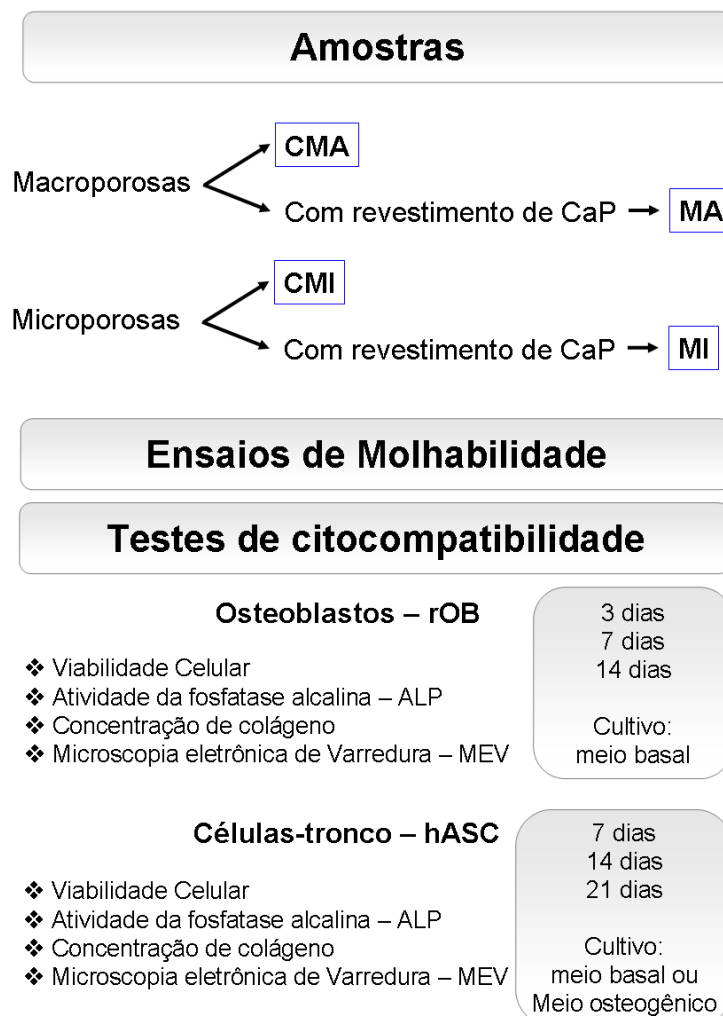


Figura 3. Microestruturas das ligas após revestimento de 21 dias com uma amplificação de 1.000x. (a) Microporosa (MI_TQT_21); (b) Macroporosa (MA_TQT_21). Foto: *Goulart, F.F. et al (2020)*.

O fluxograma abaixo resume os ensaios realizados neste capítulo da tese.



Fluxograma 1: Resumo dos ensaios realizados neste capítulo da tese.

3.2 Teste de Molhabilidade

O ângulo de contato entre as ligas de titânio-nióbio e a água foi medido usando o programa ImageJ a partir de imagens obtidas pela câmera (CoolPix P600, Nikon). Foi aplicado o método de queda sésil e, para isso, uma gotícula de água destilada com volume constante de 10 µl para confirmar a mudança nas propriedades de molhabilidade das ligas de titânio CMA, MA, CMI e MI (20, 21). As medições foram repetidas com três amostras preparadas independentemente para cada condição.

3.2 Testes de citocompatibilidade

As ligas de titânio-nióbio revestidas com fosfato de cálcio foram esterilizadas por meio do calor úmido sob pressão e, em seguida, foram realizados os ensaios de viabilidade celular, utilizando-se o Reagente resazurina, atividade da Fosfatase Alcalina, utilizando-se a solução de BCIP-NBT e a produção de colágeno pelo ensaio colorimétrico usando o kit Sircol™ Soluble Collagen Assay (Biocolor), de acordo com o protocolo detalhado anteriormente no capítulo 1.

Condições de cultivo

Para os ensaios de maturação, 1×10^5 osteoblastos foram semeados no topo das amostras e, em seguida, as amostras foram totalmente cobertas com 400 uL de meio basal. Para os ensaios de diferenciação celular, 1×10^5 células-tronco mesenquimais humanas (hASC) foram semeados no topo das amostras e, em seguida, as amostras foram totalmente cobertas com 400 uL de meio basal, a fim de manter as células indiferenciadas ou com 400 uL de meio osteogênico, a fim de estimular a diferenciação das células-tronco em osteoblastos.

3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As estruturas e disposição dos poros e células nas ligas Ti35Nb foram observadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que foram realizadas no equipamento FEI Quanta 450 FEG, localizado no Centro de Caracterização em Nanotecnologia para Materiais e Catálise (CENANO), no Instituto Nacional de Tecnologia (INT).

3.4 Análise estatística

Todos os dados quantitativos foram representados pela média \pm o desvio padrão. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Student t não pareado e o teste

ANOVA utilizando-se GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, Software GraphPad, La Jolla California, USA.

4. Resultados

4.1 Teste de molhabilidade

Nos ensaios de molhabilidade, foi mensurado o ângulo de contato entre as ligas e a água pelo método da gota séssil (20, 21). Para evitar a influência da evaporação da gota, as medidas dos ângulos foram padronizadas e as imagens utilizadas foram capturadas imediatamente após a colocação da gota. Não foi observado diferenças significativas entre os ângulos formados nas ligas macroporosas CMA ($57,59^\circ \pm 0,72^\circ$) e MA ($56^\circ \pm 1,3^\circ$). Não foi observado diferenças significativas entre os ângulos formados nas ligas microporosas CMI ($48,53^\circ \pm 3,68^\circ$) e MI ($46^\circ \pm 1,41^\circ$) (figura 4). Quando avaliamos as ligas controles macroporosas CMA ($57,59^\circ \pm 0,72^\circ$) e controle microporosas CMI ($48,53^\circ \pm 3,68^\circ$), encontramos diferenças significativas nos ângulos de contato. O mesmo ocorre quando comparamos as amostras revestidas macroporosas MA ($56^\circ \pm 1,3^\circ$) e microporosas MI ($46^\circ \pm 1,41^\circ$).

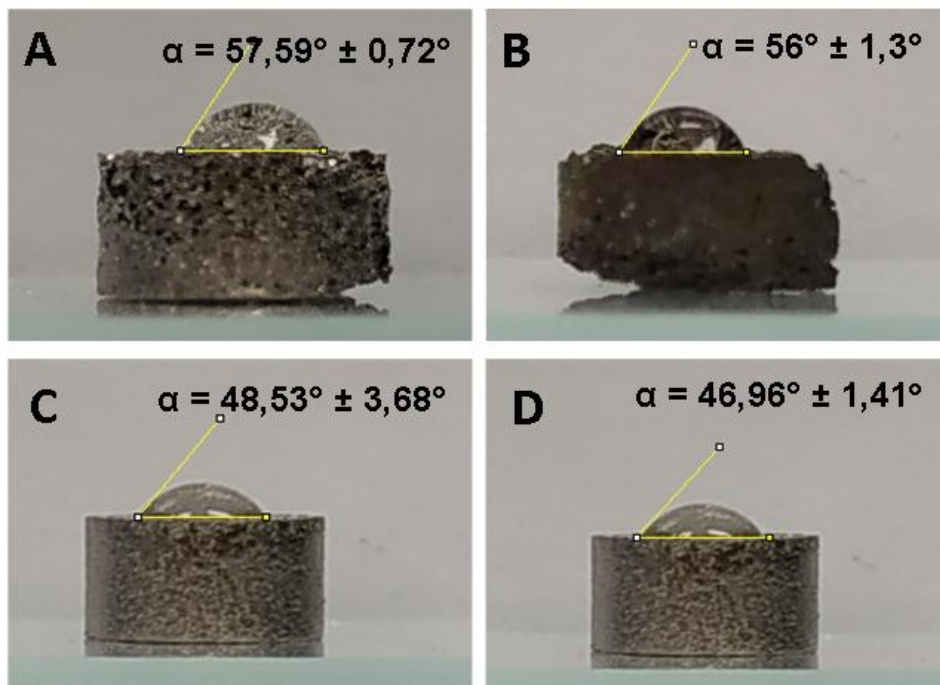


Figura 4. Ensaio de molhabilidade. O ângulo de contato entre a gota e as ligas de titânio-nióbio foi mensurado pelo ImageJ. **A.** Ligas de titânio-nióbio com macroporos. **B.** Ligas de titânio-nióbio com macroporos e revestimento de fosfato de cálcio **C.** Ligas de titânio-nióbio com microporos. **D.** Ligas de titânio-nióbio com microporos e revestimento de fosfato de cálcio. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. Foi aplicado one-way ANOVA, pós teste Tukey, $p < 0,05$.

4.2. Testes de citocompatibilidade em rOB

4.2.1 Ensaios de Viabilidade Celular

No terceiro dia de cultivo dos osteoblastos, foi observada uma menor viabilidade nas ligas CMA e MA quando comparadas ao grupo controle (Figura 5A). Aos 7 dias de cultivo, as ligas CMA e MA continuaram apresentando menor viabilidade enquanto que a liga MI demonstrou aumento na viabilidade quando comparadas aos controles (Figura 5B). Ao final dos 14 dias de cultivo, não foram observadas diferenças significativas entre as ligas e o grupo controle (Figura 5C). Quando comparamos as ligas entre si, observamos que não há diferenças significativas entre as ligas da mesma classe: macroporosas (CMA x MA) e microporosas (CMI x MI) durante todo o experimento. Em contrapartida, observamos diferenças significativas entre os grupos de ligas macroporosas e microporosas nos dias 3 e 7 de cultivo (Figura 5D e E). Em 14 dias de cultivo, observamos diferenças significativas apenas entre os grupos controles das ligas macroporosas e microporosas (CMA x CMI) (Figura 5F).

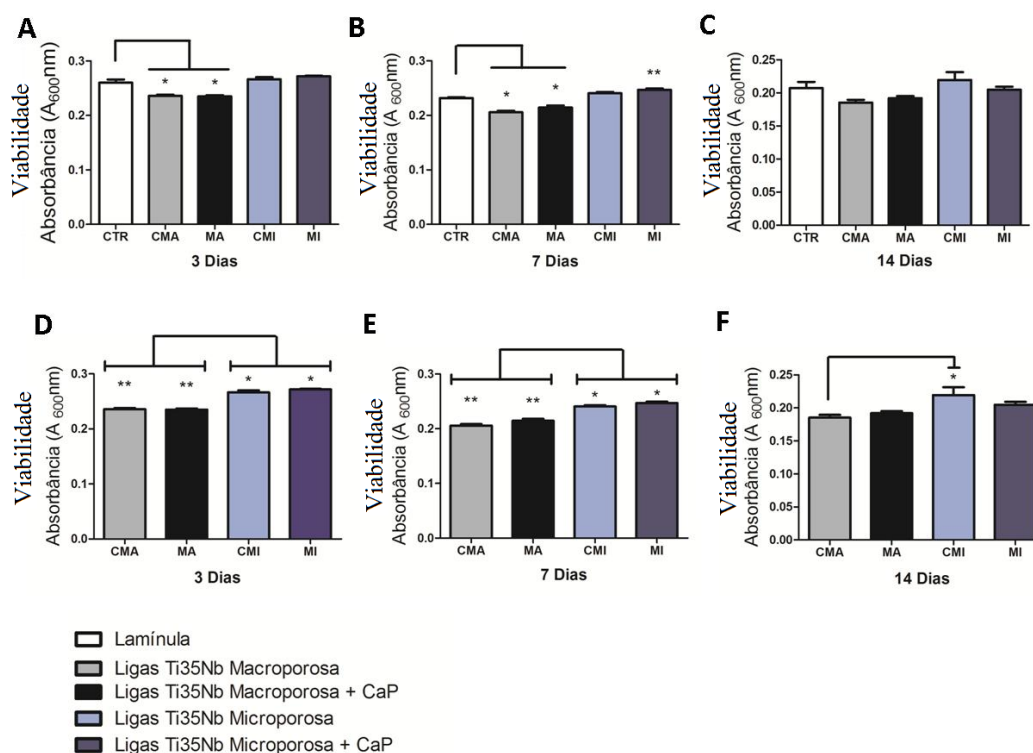


Figura 5. Avaliação da viabilidade dos osteoblastos nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea. A. Comparação com os controles em 3 dias **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio em **D.** 3 dias, **E.** 7 dias e **F.** 14 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. *significativamente menor; **significativamente menor.

4.2.2 Atividade da Fosfatase Alcalina

As análises da atividade da ALP nos osteoblastos cultivados nas ligas de titânio-nióbio demonstraram menor atividade da enzima nos grupos de ligas macroporosas (CMA e MA), quando comparadas aos grupos controles, durante todo o experimento (Figura 6A). Quando comparamos as ligas entre si, observamos que os osteoblastos cultivados na liga MA apresentam menor atividade da fosfatase alcalina durante os 14 dias de experimento (Figura 6B).

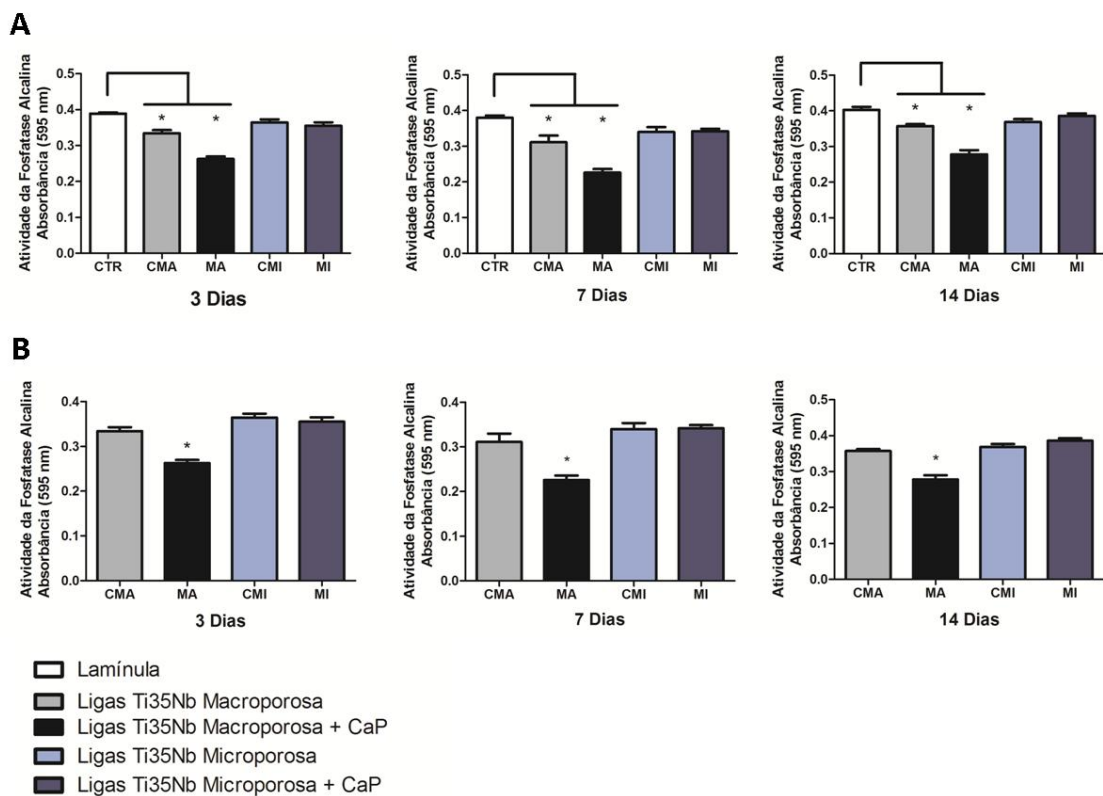


Figura 6. Síntese de fosfatase alcalina pelos osteoblastos cultivados nas ligas de titânio durante a maturação óssea. A. Comparação com os controles em 3 dias **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio em **D.** 3 dias, **E.** 7 dias e **F.** 14 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. *significativamente menor.

4.2.3 Produção de Colágeno

As análises da concentração de colágeno produzido pelos osteoblastos demonstraram não haver diferenças significativas entre as ligas nos dias 3 e 7 de cultivo, quando comparados aos controles. Entretanto, após 14 dias de cultivo, os osteoblastos cultivados na liga CMI produziram menos colágeno quando comparado ao grupo controle (Figura 7A). Comparadas entre si, as amostras não apresentaram diferenças significativas nos dias 3 e 7. No final do

ensaio, aos 14 dias, observamos uma produção de colágeno significativamente menor nas ligas CMI quando comparadas com as ligas MI (Figura 7B).

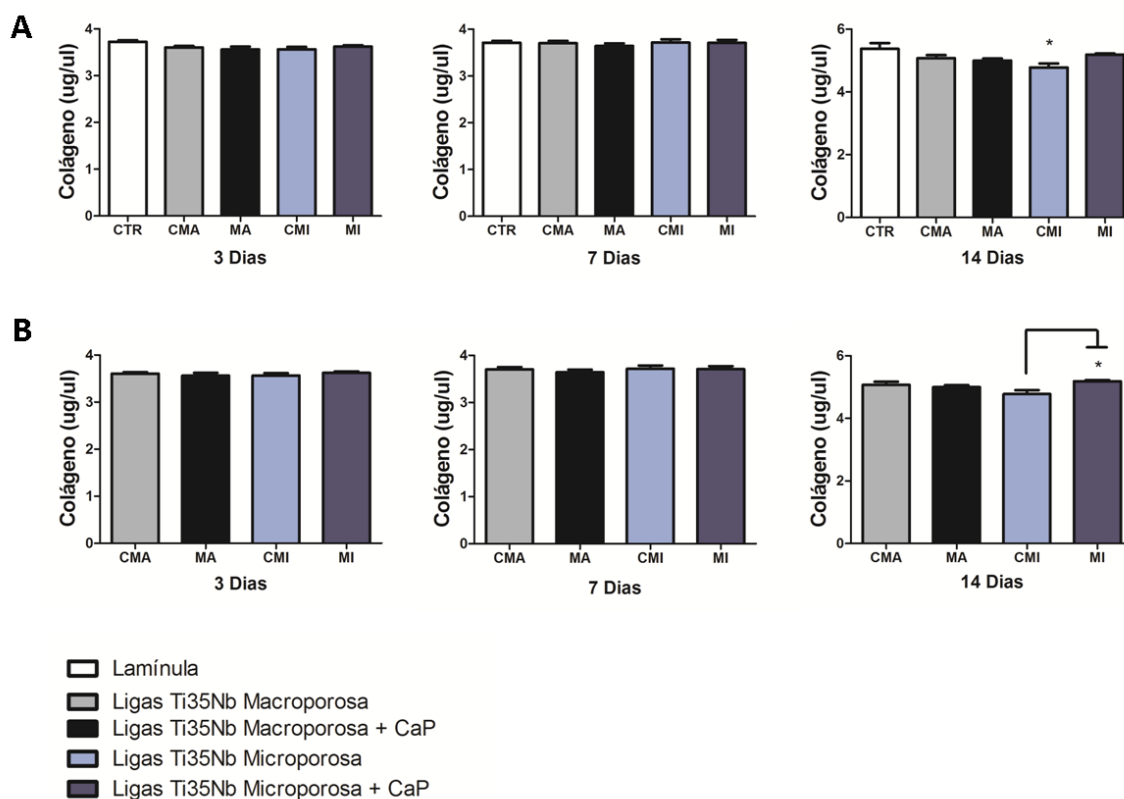


Figura 7. Produção de colágeno pelos osteoblastos cultivados nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea. A. Comparação com os controles em 3 dias **B.** 7 dias e **C.** 14 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio em **D.** 3 dias, **E.** 7 dias e **F.** 14 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$. *significativamente menor.

4.2.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após 14 dias, as amostras foram fixadas e preparadas para a aquisição das imagens no MEV. Nas imagens com aumentos de 30x, podemos observar a distribuição homogênea dos poros das amostras macroporosas que, por sua vez, são visíveis neste aumento. Em aumentos maiores (4000x), foram encontradas poucas células na superfície da amostra CMA e, as células se encontravam próximas aos poros menores. Na amostra MA, não foi encontrada nenhuma célula na superfície da amostra, ao longo de toda a varredura. Na amostra CMI e MI, em aumentos de 30x, não foi possível observar os poros formados pela união dos pós metálicos. Em maiores aumentos (4000x), podemos observar na amostra CMI a presença de osteoblastos espalhados e em comunicação, formando um “tapete de células”. Na amostra MI, agora com aumento de 3000x, podemos observar que os osteoblastos também se encontram espalhados na amostra e em contato com outros osteoblastos. Em conjunto, os dados indicam

que as ligas CMI e MI apresentaram melhor biocompatibilidade e permitiram a fixação e proliferação celular na superfície das peças.

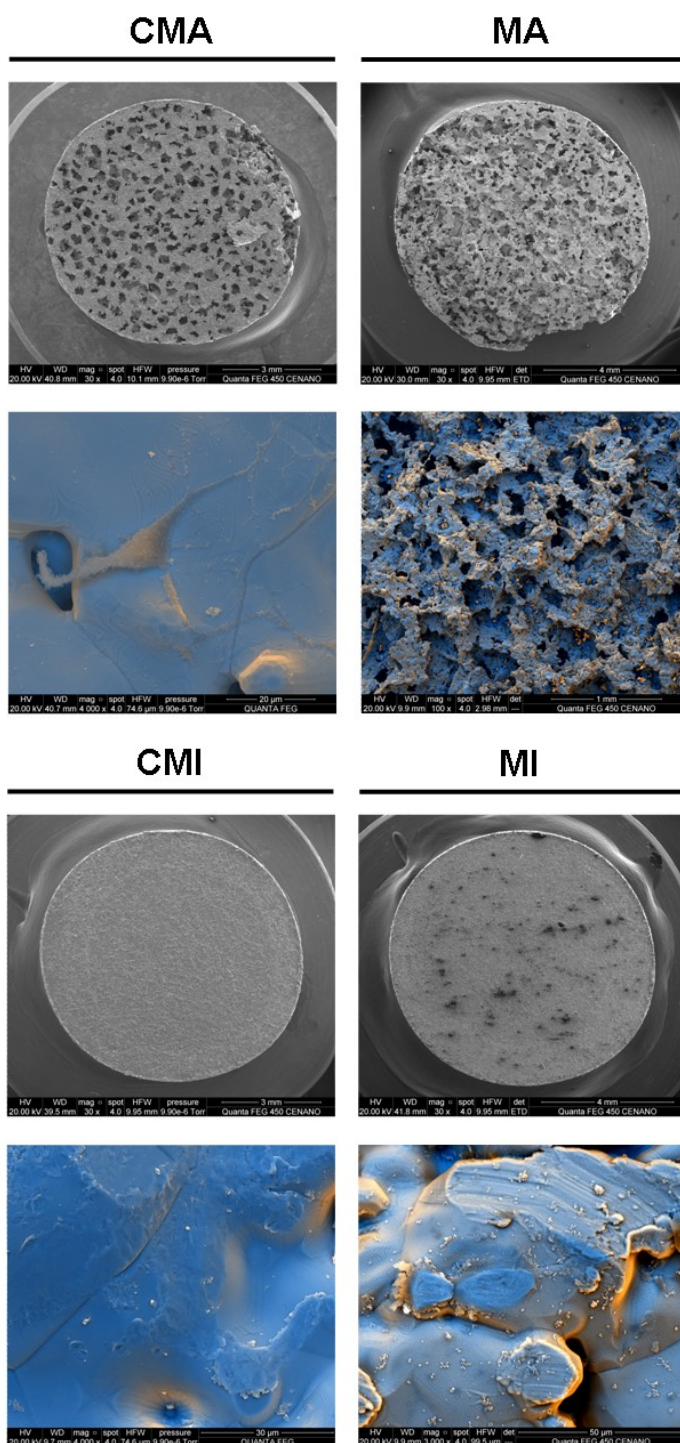


Figura 8. Imagens de MEV das ligas Ti35Nb cultivadas com rOB. CMA: Controle Macroporosa, MA: Macroporosa com revestimento de Fosfato de Cálcio, CMI: Controle Microporosa e MI: Microporosa com revestimento de Fosfato de Cálcio. Aumentos: 30x e 3000x.

4.3 Testes de citocompatibilidade em hASC

4.3.1 Ensaios de Viabilidade Celular

Foi observada uma menor viabilidade dos osteoblastos cultivados nas ligas CMA e MA que receberam o meio indutor da diferenciação osteogênica, após 7 dias de indução (Figura 9A). Não foi observada nenhuma diferença significativa na viabilidade das células após 14 (Figura 9B) e 21 dias (Figura 9C) de indução. Essa diferença na viabilidade no início da diferenciação também foi observada nas ligas CMI e MI (Figura 9D). Em contrapartida, após 14 dias de indução não foram observadas diferenças significativas entre as ligas (Figura 9E). Após 21 dias de indução, as ligas DCMI (ligas de Ti-Nb microporosas sem revestimento cultivadas com meio osteogênico) apresentaram maior viabilidade celular em comparação com as ligas CMI (Figura 9F).

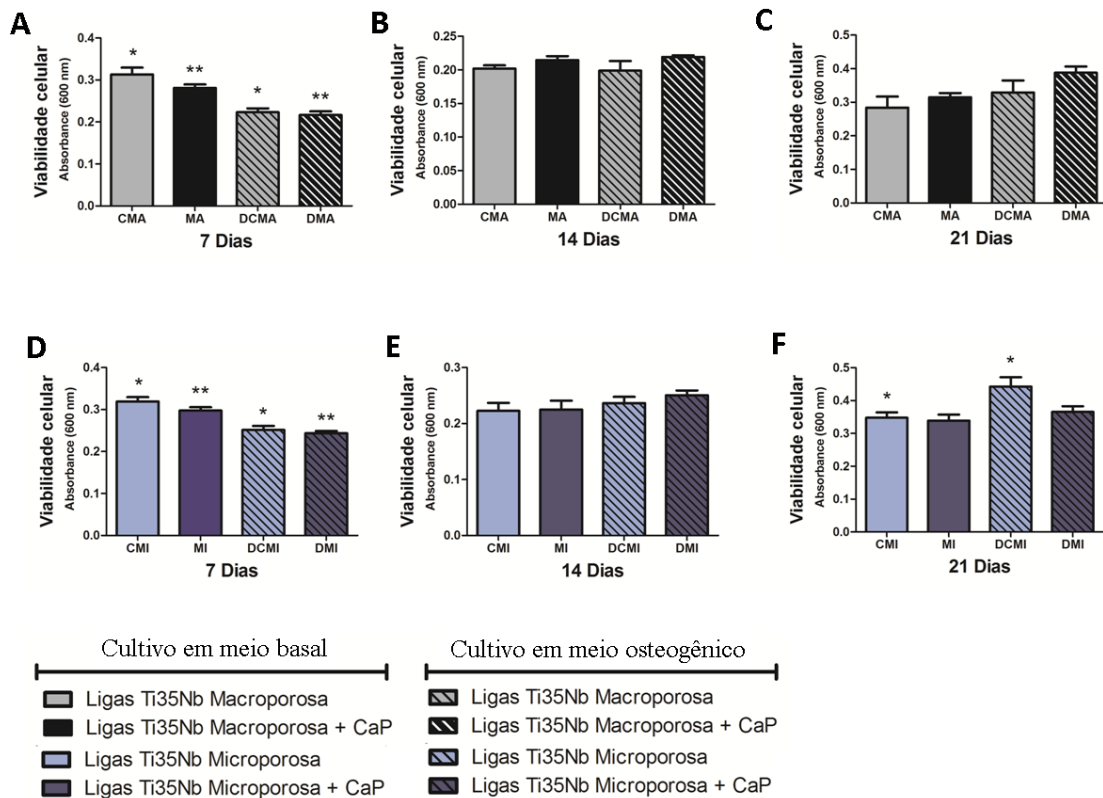


Figura 9. Avaliação da viabilidade das hASC nas ligas de titânio-nióbio durante a diferenciação celular. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio macroporosas em **A.** 7 dias **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio microporosas **D.** 7 dias **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

4.3.2 Atividade da Fosfatase Alcalina

As hASC cultivadas nas ligas CMA apresentaram maior atividade da ALP durante todo o experimento quando comparadas com as hASC cultivadas nas ligas MA e DCMA

(ligas de Ti-Nb macroporosas sem revestimento cultivadas com meio osteogênico) (Figura 10A-C). A atividade das ALP nas células cultivadas nas ligas MA se manteve estável e, no final de 21, a atividade da ALP é maior que a atividade da ALP nos grupos DMA (ligas de Ti-Nb macroporosas com revestimento de CaP cultivadas com meio osteogênico) (Figura 10A-C).

Aos 14 e 21 dias de ensaio, as células cultivadas nas ligas CMI apresentaram maior atividade da ALP quando comparadas com as células cultivadas nas ligas DCMI (Figura 10A-C). O mesmo ocorreu entre as ligas MI e DMI (ligas de Ti-Nb microporosas com revestimento de CaP cultivadas com meio osteogênico). Além do mais, em 21 dias, as células cultivadas nas ligas DMI apresentaram maior atividade da ALP quando comparadas com as células cultivadas nas ligas DCMI (Figura 10A-C).

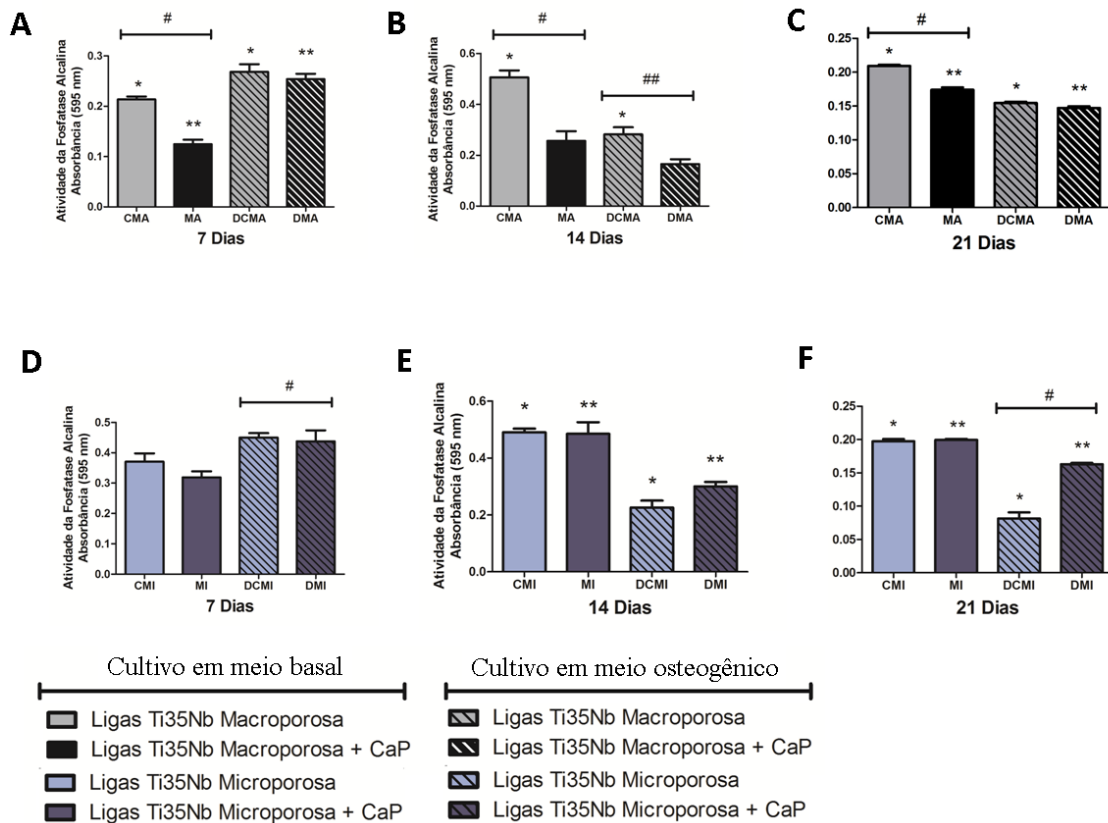


Figura 10. Síntese de fosfatase alcalina pelas hASC cultivadas nas ligas de titânio durante a diferenciação celular. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio macroporosas em **A.** 7 dias **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio microporosas **D.** 7 dias **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

4.3.3 Produção de Colágeno

Em 7 dias de cultivo, todas as hASC cultivadas apenas em meio basal apresentaram produção de colágeno significativamente maior comparadas as hASC cultivadas com meio indutor, independente do substrato no qual estavam cultivadas (Figura 11A). Ainda assim, as amostras MA apresentaram maior produção de colágeno quando comparada as amostras CMA. Em 14 dias de cultivo (Figura 11B), observamos diferenças significativas entre as amostras CMA e DCMA e entre as amostras DCMA e DMA. Observamos que essa diferença na produção de colágeno permaneceu até os 21 dias de ensaio. Ainda, aos 21 dias de cultivo, as amostras MA produziram mais colágeno quando comparadas as amostras CMA (Figura 11C).

Em contrapartida podemos observar diferenças significativas entre as amostras CMI e DCMI e entre as amostras MI e DMI durante todo o experimento. Observamos que as amostras que receberam meio indutor apresentaram menor produção de colágeno durante todo o experimento quando comparadas as amostras que receberam apenas meio basal (Figura 11D-F).

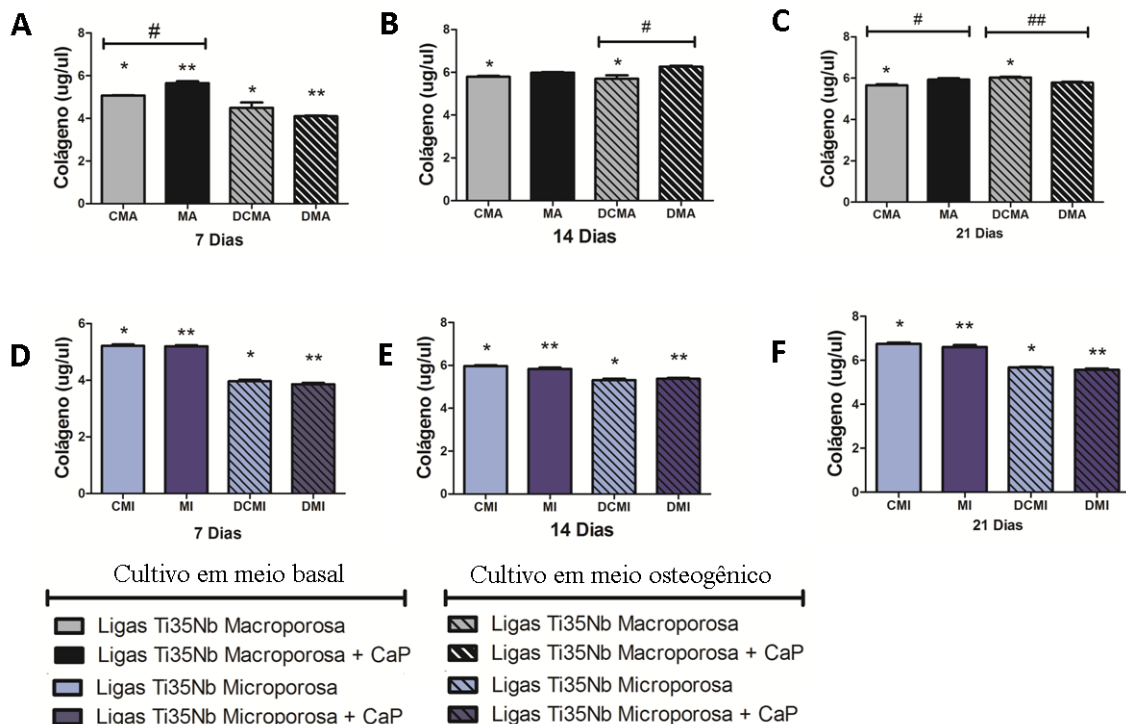


Figura 11. Produção de colágeno pelas hASC cultivadas nas ligas de titânio-nióbio durante a maturação óssea. A. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio macroporosas em **A.** 7 dias **B.** 14 dias e **C.** 21 dias de cultivo. Comparação entre as ligas de Titânio-nióbio microporosas **D.** 7 dias **E.** 14 dias e **F.** 21 dias de cultivo. Foi aplicado one-way ANOVA com Bonferroni's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. Os dados são expressos com a média \pm SEM, $n=3$.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas imagens com aumento de 30x, podemos observar os poros formados pelo formador de poros durante o processamento das amostras macroporosas (CMA, MA, DCMA e CMA) (Figura 12). Em contrapartida, não é possível visualizar os poros das amostras microporosas (CMI, MI, DCMI e DMI) nos aumentos de 30x. Em todas essas amostras, foram encontradas poucas células durante a varredura da liga. Na amostra CMA, as células se encontravam com morfologia fusiforme e bem espalhada na liga. Na amostra MI, as células se encontravam sobre os depósitos de fosfato de cálcio, espalhadas e com alguns prolongamentos. Nas amostras MA e CMI, as células se encontram em formato arredondado e próximas aos poros, indicando que estas células estão em processo de divisão celular e/ou migração para os poros das ligas. Não foi encontrada nenhuma célula nas amostras DCMA e DMA durante toda a varredura, entretanto, as imagens em maior aumento (DCMA: 1500x e DMA: 600x) indicam a deposição de sedimentos similares a matriz extracelular que pode ter sido produzida pelas células que, posteriormente migraram para dentro dos poros nestas ligas. Nas amostras DCMI e DMI, foram encontradas células próximas aos poros e próximas aos depósitos de fosfato de cálcio, respectivamente, com morfologias fusiformes. Em conjunto nossos dados mostram que as ligas são biocompatíveis, permitem a adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais humanas.

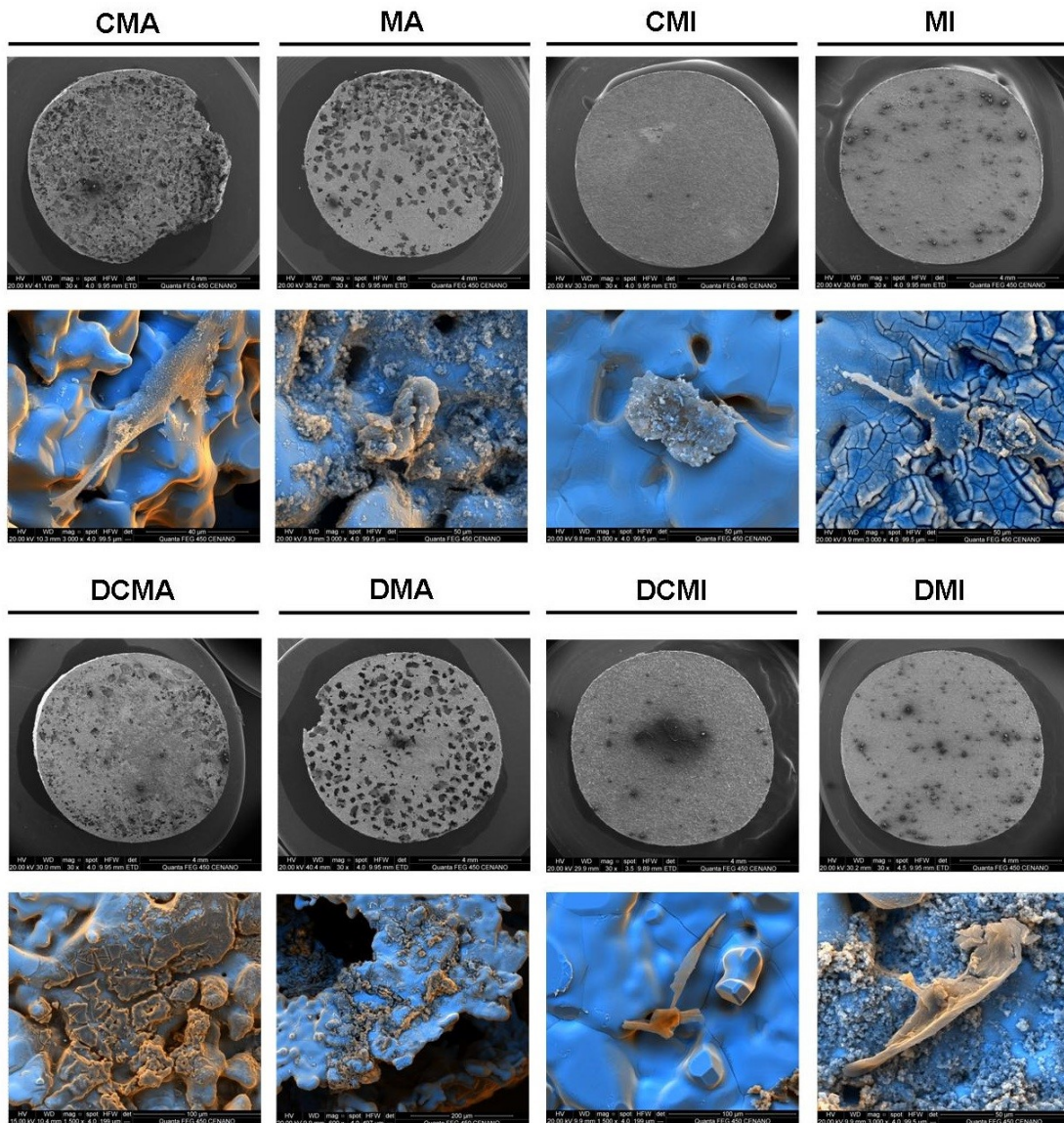


Figura 12. Imagens de MEV das ligas Ti35Nb cultivadas com hASC. Nas amostras CMA, MA, CMI e MI, as hASC foram cultivadas com meio DMEM. Nas amostras DCMA, DMA, DDMI e DMI, as hASC foram cultivadas com meio osteogênico. Aumentos: 30x e 3000x.

5. Discussão

Nosso estudo é pioneiro ao utilizar o método biomimético para depositar uma camada de fosfato de cálcio em ligas de Ti35Nb. Além do mais, não há estudos que comparam ligas macroporosas e microporosas este revestimento e utilizando dois tipos de células primárias com diferentes origens. A citocompatibilidade das ligas de titânio é de extrema importância para o sucesso do implante. Fatores na superfície do material como, a química (átomos expostos), energia da superfície, topografia e molhabilidade, influenciam diretamente na citocompatibilidade, tendo em vista que a superfície do biomaterial é o primeiro componente do implante que entra em contato com as células ou fluidos biológicos.

As ligas de Ti35Nb testadas no nosso trabalho recebeu tratamentos importantes como, o tratamento químico com NaOH, o tratamento térmico e o revestimento de fosfato de cálcio (CaP) pelo método biomimético objetivando a modificação da textura da superfície das ligas visando o melhoramento da viabilidade e osseointegração das ligas. Quando exposto a soluções fortemente alcalinas, o Ti forma rugosidade em escala micrométrica e nanométrica. Além disso, o metal forma hidretos de titânio na superfície exposta que é transformado em titanato de sódio quando submetido ao tratamento térmico e fica carregado negativamente. Esse titânio, após os tratamentos químicos e térmicos, ao ser submerso em uma solução salina (PBS e HBSS), permite a adsorção de íons Ca^{+2} (carregados positivamente), tornando a superfície do titânio positiva. Consequente, íons fosfatos são atraídos para essa superfície positiva formando a apatita (22).

Superfícies hidrofílicas permitem a adsorção de proteínas além de melhorar a adesão, propagação e proliferação celular que reflete diretamente no potencial de osseointegração das ligas. A molhabilidade de biomateriais *in vitro* é avaliada pela medida do ângulo de contato na interface líquido-sólido. Uma alta molhabilidade é representada por ângulos de contato menores de 90° , o que significa que o material é hidrofílico. Nestes casos, uma película de fluido contínua e lisa é formada sobre a superfície sólida (21). Zang et al. observaram que a adição de nióbio as ligas diminui o ângulo de contato comparadas às ligas de Ti pura (23). Nossos dados mostram que as ligas de Titânio-Nióbio são hidrofílicas e a modificação da superfície das ligas pelo método biomimético não influenciou significativamente na hidrofília das ligas (Figura 4). Lauria et al, utilizaram peróxido de hidrogênio em ligas Ti45Nb a fim de formar nanoporos na superfície das ligas. Os autores observaram mudanças significativas no ângulo de contato de ligas de Ti45Nb expostas a H_2O_2 em 24, 48 e 72hs, de forma tempo dependente, ou seja, quanto maior o tempo de exposição das ligas ao H_2O_2 , menor o ângulo de contato nas ligas e maior a hidrofília do material (24). Surpreendentemente, nossos dados mostram que a adição de formadores de poros aumentou o ângulo de contato nas ligas.

Nós avaliamos a citocompatibilidade e o potencial de maturação dos osteoblastos de ratos e diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas nas ligas Ti35Nb. Nossos dados indicaram que o revestimento biomimético com CaP das ligas não interferiu na citocompatibilidade dos osteoblastos cultivados nas ligas (Figura 5). Contudo, nossos dados indicam que a adição de formadores de poros nas ligas é prejudicial para a viabilidade dos osteoblastos. Na literatura, não há um consenso para o tamanho médio ideal dos poros em scaffolds aplicados na engenharia tecidual (25-27). Murphy et. al avaliaram o efeito na adesão

de osteoblastos em scaffolds de colágeno-glicosaminoglicano com poros com tamanho médio variando de 85 μm a 325 μm . Os autores concluíram que scaffolds com um tamanho médio de poro de 325 μm são ideais para engenharia de tecido ósseo. Contudo, os autores observaram um pico adicional inicial no número de células em estruturas com um tamanho médio de poro de 120 μm (25). Esses achados coincidem com nossos dados, que mostram uma menor viabilidade dos osteoblastos em ligas macroporosas no início do cultivo seguido do restabelecimento da viabilidade após 14 dias de cultivo. Nossa hipótese é que os poros formados são maiores do que o tamanho ideal para esse tipo celular. As ligas macroporosas apresentam poros entre 200 a 600 μm (Figura 1).

A menor viabilidade dos osteoblastos cultivados nas ligas Ti35Nb macroporosas refletiu em uma menor produção de fosfatase alcalina neste grupo (Figura 6). Contudo, os dados de produção de colágeno nos mostram que os osteoblastos cultivados nas ligas CMI apresentaram menor produção de colágeno (Figura 7). As imagens obtidas pela MEV indicam que os osteoblastos cultivados nas amostras CMA e MA penetram nestas ligas devido ao tamanho do poro distribuídos nestas ligas (Figura 8). É possível que os osteoblastos que penetram nestas ligas sofram hipóxia devido à altura da liga (3,5 mm) contribuindo assim, para a menor viabilidade encontrada nestas ligas. Em contrapartida, os osteoblastos cultivados nas amostras CMI e MI, permanecem, em maior quantidade, na superfície da liga, e observamos pontos em que há comunicação celular entre os osteoblastos cultivados (Figura 8). Durante a osteogênese, os progenitores expressam grandes quantidades de RUNX-2 que, por sua vez, conduz a expressão de genes importantes como o ALP e o Col. Os pré-osteoblastos expressam grandes quantidades de ALP e, a medida que sofrem maturação, a expressão de ALP diminui e as expressões de colágeno aumentam (28, 29). Dito isso, em conjunto, nossos dados indicam que os osteoblastos cultivados nas ligas Ti35Nb macroporosas sofrem maturação antes dos osteoblastos cultivados nas Ti35Nb microporosas e a adição do revestimento de CaP nas ligas acelerou o processo de maturação dos osteoblastos. A influência do revestimento biomimético de fosfato de cálcio no comportamento dos osteoblastos ainda é controverso (30, 31). Yu et al., observaram melhor taxa de fixação e proliferação e maior atividade da ALP de células osteoblásticas de osteosarcoma de ratos (ROS17/2.8) cultivadas em superfície de titânio tratada com solução alcalina quando comparadas às superfícies de Ti revestida com CaP (31). Em um estudo *in vivo*, He et. al, não identificaram efeitos positivos na formação de osso novo em implantes de titânio com revestimento de biomimético de fosfato de cálcio (30).

Nossos dados mostram um decréscimo na viabilidade das hASC no início do experimento, que é restabelecida no final do processo de diferenciação, em todas as amostras. O decréscimo na viabilidade das hASC diferenciadas, no início da diferenciação, decorre do próprio processo de diferenciação (Figura 9). As hASC interrompem o processo de proliferação para dar início a diferenciação em osteoblastos. Já no final do processo de diferenciação, não encontramos mais diferenças significativas entre as células indiferenciadas e diferenciadas cultivadas nas CMA e MA. Contudo, nossos dados indicam que as ligas TiNb microporosas (CMI) são benéficas para a viabilidade celular das hASC durante todo o processo de diferenciação. Estudos mostram que as ligas de TiNb são biocompatíveis e permitem a adesão e proliferação de células-tronco (32, 33). Ruan et. al avaliaram a viabilidade de células-tronco mesenquimais de coelho derivadas da medula óssea em ligas de Ti25Nb com poros de 300 a 600 μ m de diâmetro (32) nos quais foram encontradas as células aderidas, indicando que essas ligas permitem a adesão, migração e proliferação das MSCs (32).

Nós observamos maior atividade da fosfatase alcalina, nas amostras CMA e MA, cultivadas com hASC, no decorrer do experimento (Figura 10A-C). Aos 14 dias de experimento, podemos observar maior atividade da ALP nas amostras CMA enquanto que as amostras MA mantiveram a atividade da ALP em níveis constantes, durante todo o experimento. Esses dados indicam que o revestimento das ligas com CaP não acelera a diferenciação de células-tronco mesenquimais. Nas ligas macroporosas há um aumento constante na produção de colágeno em todas as ligas cultivadas com hASC (Figura 11A-C).

Observamos um aumento constante na atividade da ALP, nas amostras CMI e MI (Figura 10 D-F) cultivadas com hASC durante todo o experimento. Além do mais, as amostras CMI, MI, DCMI e DMI, a produção de colágeno aumentou, de forma constante, durante todo o processo de diferenciação (Figura 11D-F) e, as amostras que receberam apenas meio basal apresentaram maior expressão de colágeno. Esses dados em conjunto indicam um verdadeiro potencial osteogênico destas ligas visto que podemos observar o sucesso da diferenciação das hASC nas ligas CMI e MI. Komarova et. al avaliaram a capacidade osteogênica de ligas de Ti40Nb revestidas com CaP pela técnica de micro-arc oxidação (MAO) (34) na diferenciação de hASC (35). Em estudos in vitro, os autores verificaram a capacidade osteogênica da liga, porém, a adição de zinco juntamente com o CaP, como revestimento das ligas Ti40Nb estimulou a motilidade hASC, auxiliando um possível mecanismo de osteocondução na interface implante-células (35).

6. Conclusão

Em conjunto os dados nos mostraram que as ligas testadas neste estudo são biocompatíveis e permitem o crescimento celular de osteoblastos e células-tronco mesenquimais humanas. As ligas Ti35Nb microporosas mostram uma melhor eficiência na proliferação de osteoblastos de ratos, mas sem grandes prejuízos na maturação destas células, quando comparadas às ligas Ti35Nb macroporosas. A adição do revestimento de fosfato de cálcio pelo método biomimético em ligas Ti35Nb macroporosas melhorou a osteogênese das hASCs nestas ligas, enquanto que as ligas Ti35Nb microporosas, por si só, são eficientes na promoção da osteogênese de hASC. Ainda assim, novos ensaios são necessários para elucidar o comportamento das células na superfície do material de forma a aprimorar as ligas visando à aplicação *in vivo*.

7. Perspectivas

- ❖ Testar a hipótese das células estarem alojadas no interior das ligas e sofrendo hipóxia.
- ❖ Avaliar o comportamento corrosivo do material, através de ensaios de corrosão, além de testes mecânicos de flexão e compressão.
- ❖ Testar novos formadores de poros, com dimensões variadas e verificar se o tamanho do poro colabora para uma melhora na osteogênese.
- ❖ Realizar ensaios *in vivo* para avaliar o comportamento da liga no microambiente ósseo. *In vivo*, o biomaterial sofre influências do ambiente, fatores físicos e bioquímicos, que impactam na viabilidade dos enxertos. Além disso, os enxertos provocam respostas inflamatórias e haverá no local uma neovascularização que afeta significativamente a neoformação óssea

8. Referências

1. Valiathan MS, Krishnan VK. Biomaterials: an overview. *The National medical journal of India*. 1999;12(6):270-4.
2. Hudecki A, Kiryczyński G, Łos MJ. Chapter 7 - Biomaterials, Definition, Overview. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* 2019. p. 85-98.
3. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2020;108(8):1617-33.
4. Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone research*. 2017;5:17059.
5. Li J, Cui X, Hooper GJ, Lim KS, Woodfield TBF. Rational design, bio-functionalization and biological performance of hybrid additive manufactured titanium

- implants for orthopaedic applications: A review. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2020;105:103671.
6. Hung BP, Hutton DL, Grayson WL. Mechanical control of tissue-engineered bone. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(1):10.
 7. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature materials*. 2007;6(12):997-1003.
 8. Patel D, Kim SH, Qiu W, Maeda M, Matsumoto A, Nishijima G, et al. Niobium-titanium (Nb-Ti) superconducting joints for persistent-mode operation. *Scientific reports*. 2019;9(1):14287.
 9. Kent D, Wang G, Dargusch M. Effects of phase stability and processing on the mechanical properties of Ti-Nb based beta Ti alloys. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2013;28:15-25.
 10. Biesiekierski A, Wang J, Gepreel MA, Wen C. A new look at biomedical Ti-based shape memory alloys. *Acta biomaterialia*. 2012;8(5):1661-9.
 11. Arifvianto B, Zhou J. Fabrication of Metallic Biomedical Scaffolds with the Space Holder Method: A Review. *Materials*. 2014;7(5):3588-622.
 12. Sing SL, An J, Yeong WY, Wiria FE. Laser and electron-beam powder-bed additive manufacturing of metallic implants: A review on processes, materials and designs. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2016;34(3):369-85.
 13. Chen Y, Zhang X, Parvez MM, Liou F. A Review on Metallic Alloys Fabrication Using Elemental Powder Blends by Laser Powder Directed Energy Deposition Process. *Materials*. 2020;13(16).
 14. Rhodes CG. *Microscopy and Titanium Alloy Development* 1986.
 15. Sri Maha Vishnu D, Sure J, Liu Y, Vasant Kumar R, Schwandt C. Electrochemical synthesis of porous Ti-Nb alloys for biomedical applications. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2019;96:466-78.
 16. Szczes A, Holysz L, Chibowski E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Advances in colloid and interface science*. 2017;249:321-30.
 17. Saleh MM, Touny AH, Al-Omair MA, Saleh MM. Biodegradable/biocompatible coated metal implants for orthopedic applications. *Bio-medical materials and engineering*. 2016;27(1):87-99.
 18. Goulart FF, Balestra RM. Deposição de revestimento de fosfato de cálcio em liga de titânio-niôbo por método biomimético. *Dissertação de Mestrado*. 2020.
 19. Andrade MCd, Filgueiras MR, Ogasawara T. Hydrothermal nucleation of hydroxyapatite on titanium surface. *Journal of the European Ceramic Society*. 2002;22(4):505-10.
 20. Zhao T, Jiang L. Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2018;161:324-30.
 21. Schuster JM, Schvezov CE, Rosenberger MR. Influence of Experimental Variables on the Measure of Contact Angle in Metals Using the Sessile Drop Method. *Procedia Materials Science*. 2015;8:742-51.
 22. Kokubo T, Yamaguchi S. Bioactive titanate layers formed on titanium and its alloys by simple chemical and heat treatments. *The open biomedical engineering journal*. 2015;9:29-41.
 23. Zhang Y, Sun D, Cheng J, Tsoi JKH, Chen J. Mechanical and biological properties of Ti-(0-25 wt%)Nb alloys for biomedical implants application. *Regenerative biomaterials*. 2020;7(1):119-27.

24. Lauria I, Kutz TN, Boke F, Rutten S, Zander D, Fischer H. Influence of nanoporous titanium niobium alloy surfaces produced via hydrogen peroxide oxidative etching on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2019;98:635-48.
25. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(3):461-6.
26. Bruzauskaite I, Bironaite D, Bagdonas E, Bernotiene E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*. 2016;68(3):355-69.
27. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effect of sintered beta-dicalcium pyrophosphate particle size on newborn Wistar rat osteoblasts. *Artificial organs*. 1999;23(4):331-8.
28. Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific transcription factor Osterix (Osx) is an upstream regulator of *Satb2* during bone formation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(38):32995-3002.
29. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*. 1997;89(5):747-54.
30. He F, Yang G, Wang X, Zhao S. Bone responses to rough titanium implants coated with biomimetic Ca-P in rabbit tibia. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2009;90(2):857-63.
31. Yu X, Wei M. Cellular performance comparison of biomimetic calcium phosphate coating and alkaline-treated titanium surface. *BioMed research international*. 2013;2013:832790.
32. Ruan J, Yang H, Weng X, Miao J, Zhou K. Preparation and characterization of biomedical highly porous Ti-Nb alloy. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2016;27(4):76.
33. Chen Y, Han P, Dehghan-Manshadi A, Kent D, Ehtemam-Haghighi S, Jowers C, et al. Sintering and biocompatibility of blended elemental Ti-xNb alloys. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2020;104:103691.
34. Komarova EG, Sharkeev YP, Sedelnikova MB, Prosolov KA, Khlusov IA, Prymak O, et al. Zn- or Cu-Containing CaP-Based Coatings Formed by Micro-arc Oxidation on Titanium and Ti-40Nb Alloy: Part I-Microstructure, Composition and Properties. *Materials*. 2020;13(18).
35. Komarova EG, Sharkeev YP, Sedelnikova MB, Prymak O, Epple M, Litvinova LS, et al. Zn- or Cu-containing CaP-Based Coatings Formed by Micro-Arc Oxidation on Titanium and Ti-40Nb Alloy: Part II-Wettability and Biological Performance. *Materials*. 2020;13(19).

CAPÍTULO 4: USO DE SUPORTES DERIVADOS DA MATRIZ DESCCELULARIZADA DE FÍGADO NA MANUTENÇÃO DO *CELL FATE* DE HEPATÓCITOS E OSTEÓBLASTOS

1. Introdução

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em 2018, o carcinoma hepatocelular (câncer de fígado) foi considerado o quinto câncer mais comum em homens e o nono câncer mais comum em mulheres (o sexto câncer mais comum no mundo) e geralmente a maioria dos pacientes com esta doença morre dentro de um ano (1, 2). O tratamento médico para câncer de fígado, incluindo quimioterapia, quimo embolização e ablação não são muito eficazes. No estágio final de doenças hepáticas, como carcinoma hepatocelular ou cirrose, o tratamento mais adequado é o transplante de fígado, seja um transplante ortotópico ou um transplante intervivos (3). Contudo, o transplante hepático é severamente limitado pela escassez de fígados de doadores disponíveis (4).

Uma alternativa muito utilizada na medicina regenerativa é a administração de substâncias em *scaffolds* implantáveis (5). Os *scaffolds* podem ser construídos a partir de uma variedade de proteínas, como colágeno e a matriz extracelular descclularizada. Associados a esses *scaffolds*, materiais em escalas nanométricas, como o nanotubo de carbono (6-8) e o óxido de grafeno (9), contribuem com suas propriedades físicas, químicas e biológicas trazendo diferenças fundamentais para a característica dos *scaffolds*, auxiliando na sua eficácia e segurança.

1.1. Hepatócitos

O fígado é o segundo maior órgão do corpo humano. É o responsável pela síntese e secreção da maioria das proteínas do sangue, pela síntese de bile, sais biliares, colesterol e lipoproteínas, faz o armazenamento de glicose, vitaminas e minerais, remove substâncias nocivas, transformando-as em compostos menos nocivos e, além disso, são responsáveis pela conversão de amônia em uréia e pela depuração da bilirrubina. O fígado também é importante na modificação de hormônios, mediante combinação com substâncias que os inativam ou proteínas que permitem seu transporte no organismo, no metabolismo de fármacos e desintoxicação de agentes químicos. Portanto, o fígado é extremamente importante para a manutenção da homeostase corporal (10).

Os hepatócitos são as principais células formadoras do parênquima hepático, além das células endoteliais, colangiócitos, células de *Kupffer*, células *pit* e células estreladas que também são importantes para a correta funcionalidade dos hepatócitos bem como do fígado (11, 12). Hepatócitos são células metabolicamente ativas envolvidas na regulação de várias funções bioquímicas e metabólicas e na síntese de algumas substâncias no corpo. São eles os responsáveis pela absorção e armazenamento de glicose, minerais e vitaminas e pela síntese de fatores de coagulação, proteínas transportadoras, colesterol e componentes biliares (10-12).

Os hepatócitos, dentro de cada lóbulo, dispõem-se em cordões celulares e estão separados por capilares sinusóides, formando o espaço de Disse, e em contato com células endoteliais, intermediado por escassa matriz extracelular (11). Cada lóbulo do fígado é organizado em três zonas, que são determinadas pelo fluxo de sangue dentro dos acinus. A zona 1 é denominada zona periportal (PP) e os hepatócitos localizados nesta zona estão em contato com o sangue aferente, rico em oxigênio. É a região em torno da veia porta e das terminações da arteríola. Em uma localização lobular mediana, está localizada a zona 2 e a zona perivenosa (PV) caracteriza a zona 3 e está mais próxima da veia centrolobular eferente (12) (Figura 1).

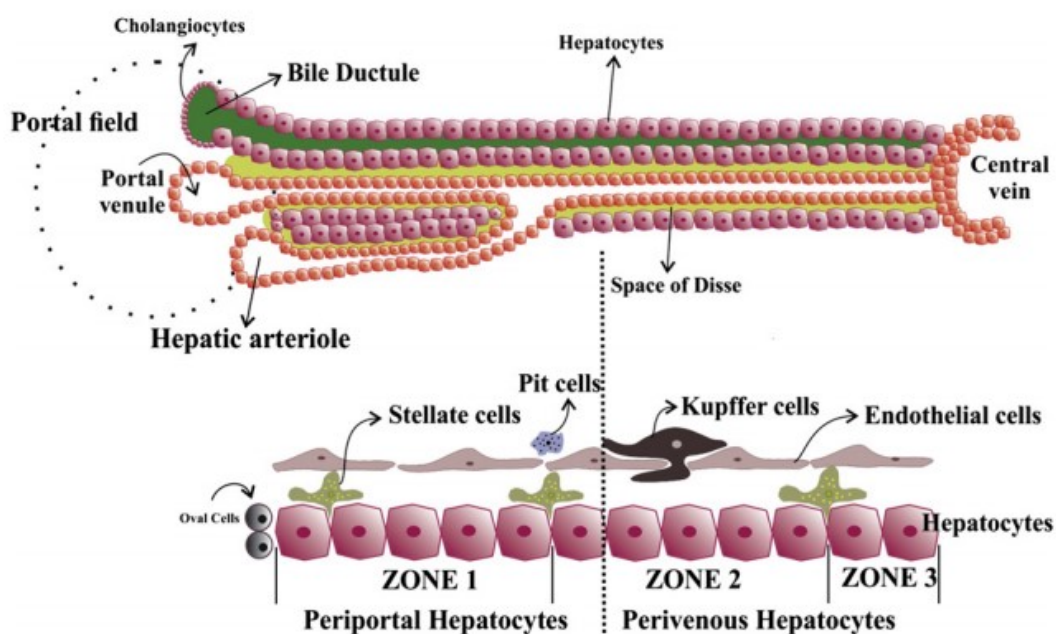


Figura 1. Arquitetura do fígado. O fígado é organizado em três zonas e os hepatócitos são metabolicamente diferentes. Figura retirada de Vasconcellos et al (13).

O cultivo de hepatócitos primários é muito utilizado no estudo de hepatotoxicidade e metabolismo de drogas, mas recentemente também estão sendo utilizados na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas doenças hepáticas (14). Contudo, os hepatócitos

podem ser cultivados por curtos períodos de tempo, perdendo grande parte da sua funcionalidade e viabilidade em apenas 24 horas (15).

Devido à dificuldade de obtenção e manutenção de hepatócitos primários em culturas celulares, os estudos *in vitro* com a finalidade de investigar mecanismos de toxicidade e terapias alternativas para o tratamento de câncer hepático são realizados em linhagens celulares, como a HepG2. Contudo, com o decorrer do aumento das passagens, essas células podem perder suas características originais e, desta forma, nem sempre são os melhores modelos experimentais. Atualmente, o padrão ouro para testes de fármacos são os animais de pequeno porte. Muitos testes de biotransformação de fármacos são realizados primeiramente em roedores e, conseqüentemente, os ensaios necessitam de muitos animais por grupo experimental para serem consideradas drogas seguras e eficazes. É necessário salientar que, diversas enzimas cooperam entre si durante o processo de biotransformação de drogas específicas e cada espécie possui uma maquinaria própria para metabolizar determinado fármaco. Como esses estudos não levam em consideração a diferença metabólica entre as espécies, a finalidade dos mesmos se resume em entender os mecanismos de atuação dos fármacos em enfermidades que não acometem somente os seres humanos. Dito isso, é de extrema importância estudos que visam o aumento da viabilidade e funcionalidade de hepatócitos primários em culturas.

1.2. Colágeno

Há muito se estuda melhores formas de manter a polaridade, função e viabilidade de hepatócitos em cultura. Os hepatócitos são células dependentes de ancoragem e, em culturas celulares, mantêm maior viabilidade e funções de hepatócitos quando em contato com um substrato (16). O colágeno é padrão ouro em revestimento de culturas de hepatócitos (15, 17, 18).

O protocolágeno é uma hélice tripla formada por 3 cadeias α dos aminoácidos prolina, hidroxiprolina e glicina, formando o domínio GlyX-Y. A glicina é encontrada a cada três posições das cadeias polipeptídicas e está sempre ligada aos aminoácidos X e Y (prolina e hidroxiprolina). O colágeno sofre várias modificações pós-translacionais importantes para a manutenção da sua estrutura e estabilidade que refletem diretamente no comportamento dos tecidos e órgãos (19, 20). Por exemplo, a prolina sofre uma hidroxilação durante as modificações pós-translacionais, formando a hidroxiprolina (21). O colágeno tipo I é um grupo formador de fibrilas e, consistem em duas cadeias α -1, uma cadeia α -2 e um colágeno

regular secundário (folha β). Os monômeros de colágeno tipo I se auto-montam para formar a fibra macromolecular via fibrilogênese tornando as moléculas de colágeno estáveis à temperatura corporal (19-21).

O colágeno é uma das principais proteínas da matriz extracelular (ECM) (17, 22) e está envolvida em uma gama de atividades celulares, como a fixação de células, migração, proliferação, diferenciação e expressão gênica (17). O colágeno tipo I é altamente versátil e pode ser aplicado como suporte em culturas celulares, associados ou não a outras moléculas (17). Podem ser extraídos de animais, como mamíferos, anfíbios, aves e peixes. Nosso trabalho utiliza o colágeno extraído do tendão da cauda de ratos Wistar, uma metodologia barata, rápida e que se tornou popular na engenharia tecidual (18).

Até o momento, foram identificados 29 tipos de colágeno (17). Na matriz extracelular (MEC) do fígado, foram encontrados 4 tipos de colágenos: colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo V e colágeno tipo VI (22). Frequentemente, colágenos tipo III, V, VI, fibronectina (FN) e vários proteoglicanos são encontrados na superfície de colágenos tipo I (22).

Pequenas concentrações de colágeno em finas camadas são o suficiente para aumentar a fixação e sobrevivência dos hepatócitos e, desta forma, proporcionar o cultivo prolongado de células hepáticas (15). Ainda assim, os hepatócitos rapidamente se desdiferenciam e perdem sua função hepática em poucas horas. Novas metodologias e técnicas de cultivo vêm sendo testadas a fim de melhorar a viabilidade dos hepatócitos em cultura. Wang et al testaram a eficácia tanto da mistura de gel de colágeno e hepatócitos quanto de culturas em camadas duplas (cultura sanduíche) e verificaram uma melhora na manutenção da função hepáticas destas células (18). Entretanto, culturas sanduíches representam uma barreira de transferência de massa que impede a difusão de solutos do meio de cultura e dificulta os estudos de imagem. Não obstante, os hepatócitos são viáveis, *in vitro*, por 5 a 7 dias e morrem após uma rodada do ciclo celular (18, 23).

1.2. Matriz extracelular

A adição de substratos às culturas celulares é extensamente utilizada na medicina regenerativa objetivando o aumento na eficiência e manutenção da cultura diferenciada (13). A forma e arquitetura das células são ditadas e mantidas pela polaridade celular que, por sua vez, é orquestrada pela comunicação entre matriz extracelular e as células, que são capazes de reorganizar o citoesqueleto, viabilizando a transcrição de genes específicos (24, 25).

Pensando-se nisso, várias matrizes começaram a ser produzidas de modo a mimetizar da melhor forma possível o ambiente *in vivo*. No mercado, há tempos se é comercializado substratos para culturas celulares e, um dos mais eficazes é o Matrigel (13). O Matrigel é composto por colágeno tipo IV, laminina, entactina e proteoglicanos. Apesar de eficiente e seu extenso uso na diferenciação celular, o uso do Matrigel encarece a manutenção da cultura, se tornando um insumo de baixa disponibilidade nos laboratórios (13). Com isso, os laboratórios desenvolveram técnicas de descelularização para obter andaimes, carregados de sinais mecânicos e bioquímicos, para serem aplicados nas culturas celulares (13).

A matriz extracelular é um componente amorfo, presente em todos os tecidos, composto por água, proteínas e polissacarídeos que fornecem sugestões bioquímicas e biomecânicas responsáveis pela morfogênese, diferenciação e homeostase do órgão (26). Cada órgão possui uma ECM com características físicas e bioquímicas próprias, como resistência à tração e compressão, elasticidade, retenção de água, que mantêm a homeostase daquele órgão. A ECM está em constante remodelamento, enzimático ou não, e seus componentes moleculares estão submetidos a modificações pós-traducionais, estabelecendo uma interação constante entre células-matriz que envolve diversos fatores de crescimento e receptores celulares ao longo do desenvolvimento e manutenção do órgão (26).

O comportamento celular, quando em cultivo em monocamada, é bem diferente de quando cultivado em matriz 3D. A matriz extracelular promove a formação de um arcabouço para as células, sendo formado *in vivo* por diversas glicoproteínas incluindo fibronectina, colágenos, lamininas e proteoglicanos, além de fatores de crescimento diversos. Todos esses fatores são vestígios que direcionam a diferenciação e manutenção da linhagem celular (27-29). Pesquisadores observaram que a concentração de ECM no revestimento é capaz de direcionar o comportamento da cultura. Hepatócitos cultivados em revestimentos com concentrações de 1g/cm^2 apresentam um caráter proliferativo. Se reduzirmos a concentração de ECM no revestimento para 1ng/cm^2 , os hepatócitos perdem a capacidade proliferativa, apresentando um fenótipo de célula madura (23).

Além do mais, a ECM imita o ambiente *in vivo* e, células cultivadas em ECM derivadas de seu tecido de origem apresentam melhores resultados na proliferação e na manutenção do fenótipo celular. O ECM mantém um crosstalk com as suas células residentes, de modo que possam sofrer mudanças em sua organização e composição estrutural em resposta às mudanças metabólicas no tecido (13). A matriz extracelular de fígados

decelularizados (LEM), especificamente, é composta principalmente de colágeno tipo I, proteínas e peptídeos do fígado, apresentam cerca de 40% dos níveis de HGF e β FGF preservados, mantém a membrana basal, as fibras de elastina na rede endotelial e o sistema vascular intacto, tornando-se vantajosas em estudos de diferenciação celular (13). Além do mais, quando comparadas as matrizes de colágeno tipo I, as matrizes formadas de LEM apresentam melhor propriedades elásticas e gelatinização rápida sem comprometer o volume da cultura celular.

1.3. Nanomateriais

Nos últimos anos, os materiais nanométricos são aplicados em diversos ramos da indústria que utilizam a nanotecnologia como a mais nova abordagem tecnológica, como a indústria de cosméticos, robótica e nanoeletrônica (30, 31). Os nanomateriais são assim classificados, pois apresentam, pelo menos, uma de suas dimensões em escala nanométricas, com tamanhos que varia de 1 a 100 nm (30, 32).

Os nanomateriais tornaram-se foco de pesquisas com biomateriais objetivando a produção de sistemas de *scaffolds* para a engenharia de tecidos e distribuição de genes e drogas (30, 33). Contudo, cada nanomaterial se diferencia de várias formas em suas propriedades físicas, químicas e biológicas e essas diferenças são fundamentais para sua eficácia e segurança.

1.3.1. nGO

O grafeno é um nanomaterial formado apenas por ligações sp^2 entre seis átomos carbonos, formando estruturas hexagonais e dispostas em uma camada única, organizados uma rede semelhante à favos de mel (34, 35) (Figura 2). O grafeno foi desenvolvido pela primeira vez em 2004 e apresentam propriedades físico-químicas atrativas, como a elevada área superficial, excelente condutividade térmica e elétrica e elevada resistência mecânica (36). O grafeno pode dar origem a outros alótropos de carbono como os fulerenos e os nanotubos de carbono (Figura 2). Apesar de ser um nanomaterial hidrofóbico e, portanto, insolúvel em meio aquoso (34), o grafeno pode ser facilmente funcionalizado a outros materiais (35, 36).

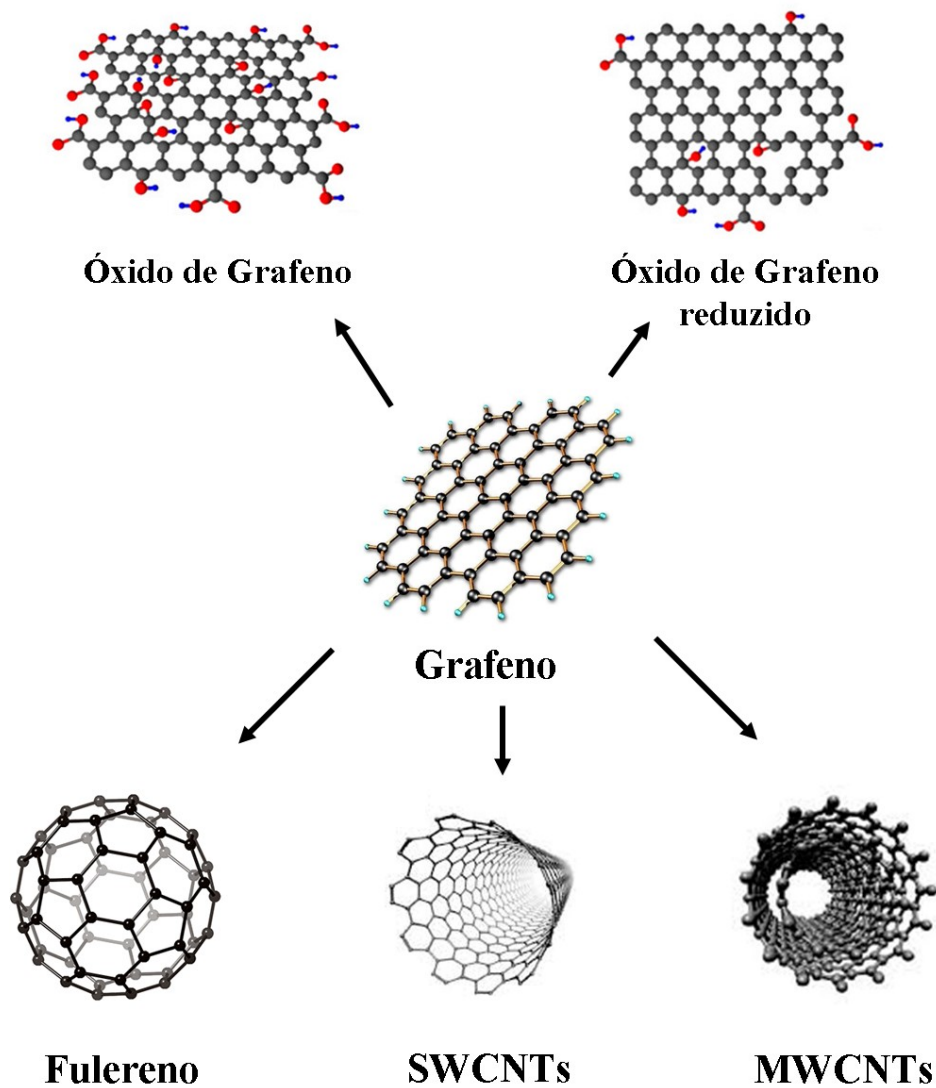


Figura 2. Nanomateriais alótropos do carbono. O grafeno pode sofrer modificações químicas e gerar nanomateriais derivados com diferentes propriedades químicas e físicas, como os óxidos de grafeno, o fulereno e os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) e de paredes múltiplas (MWCNTs). *Fonte: próprio autor.*

O grafeno pode sofrer modificações químicas e gerar nanomateriais derivados com propriedades químicas e físicas diferentes do grafeno, denominadas de óxido de grafeno (GO) (35) (Figura 2). O GO possui estrutura semelhante ao grafite, contudo, estão presentes grupos funcionais contendo oxigênio, como carbonilas, hidroxilas e grupos epóxi em ligações sp^2 com carbonos. Os GO podem ser facilmente reduzidos por métodos químicos e físicos, formando os rGO. Essas modificações encontradas no GO e rGO tornam esses nanomateriais mais reativos e facilmente podemos torná-los mais hidrofílicos, característica essencial para as aplicações biomédicas (34).

Sendo assim, os GO podem ser modificados, por meio de adsorção física ou ligação química, e receber grupos funcionais de superfície variados. Pesquisadores relataram o sucesso na funcionalização de GO com biomoléculas como DNA, peptídeos, anticorpo / antígeno e biotina / avidina (36). Quando funcionalizados, o GO pode atuar como transportador de moléculas, como genes e drogas para células vivas, além do benefício de poderem ser detectados em tempo real em células vivas. Esta nova tecnologia de mecanismo de entrega apresentam vantagens incomparáveis como a proteção dos oligonucleotídeos da clivagem enzimática durante a entrega a espaços inter ou intracelulares, aumento da eficiência da entrega e da capacidade de direcionamento de drogas anticâncer (36).

Apesar da grande possibilidade de aplicações no campo biomédico, ainda são necessários muitos estudos com os GO e seus produtos funcionalizados. A citotoxicidade, o mecanismo de captação celular e a via metabólica intracelular dos produtos funcionalizados devem ser extensivamente investigados para posteriormente poderem ser aplicados *in vivo* com segurança.

1.3.2. NTC

Os nanotubos de carbono (NTC) foram descobertos em 1991, por Iijima et al. (37), e desde então tem despertado o interesse dos pesquisadores. São materiais à base de carbono, incluídos na classe dos fulerenos e são produzidos a partir de folhas de grafeno (31, 38) que se enrolam, formando os NTC, em forma de fibras cilíndricas ocas com tamanho nanométrico (30, 31) (Figura 2). Nos NTCs, os átomos de carbono estão ligados por ligações sp^2 , característica responsável pelas suas propriedades elétricas, químicas, mecânicas e térmicas peculiares que despertam o interesse dos pesquisadores (31). Os NTC apresentam baixa densidade, alta resistência à tração (maior do que o diamante) e excelente condutividade elétrica e térmica (30, 31).

Os NTCs podem ser classificados em nanotubos de carbono de parede única (single-walled carbon nanotubes - SWNTC) ou nanotubos de carbono de paredes múltiplas (multiwalled carbon nanotubes - MWNTC). Os SWNTCs são formados por uma única folha de grafeno enrolada concentricamente em torno de si, formando um tubo oco (Figura 2). Dentre os NTCs, são os que apresentam menor diâmetro, variando de 0,5 a 1,5 nm. Em ambos os NTCs, seu comprimento pode variar em escala micrométrica. Os MWNTCs são formados por múltiplas folhas de grafeno enroladas concentricamente em torno do eixo do tudo e apresentam diâmetros maiores, chegando até 100nm (31).

De um modo geral, estudos mostraram que os NTCs são biocompatíveis e podem ser aplicados seguramente, em baixas concentrações, em organismos vivos (30). Entretanto, isolados, os NTCs apresentam baixa solubilidade em soluções aquosas, exibindo forte tendência a se aglomerarem (34). Dito isso, os pesquisadores passaram a combinar diversos materiais bioativos com NTCs com o intuito de desenvolver novos materiais para aplicações biomédicas. Juntos, os NTCs funcionalizados a outros materiais somam suas características, podendo potencializar respostas celulares, tornando os compósitos mais biocompatíveis, bioativos e funcionais (30, 33).

Em geral, os nanomateriais são partículas nanométricas com alto grau de carga superficial e (39) esta alta reatividade superficial facilita a permeabilidade celular dos nanomateriais e seu influxo é capaz de interferir em atividades biológicas a nível celular, como transcrição, migração e tráfico celular e alteração nas atividades enzimáticas (39, 40). Contudo, a disponibilidade das nanopartículas deve ser controlada de visto que o excesso de nanopartículas disponibilizadas para o corpo por várias rotas pode induzir citotoxicidade biológica (40) e até mesmo apoptose (39). Os NTCs e nGOs podem apresentar uma gama de grupos funcionais em suas superfícies facilitando a integração de hidrogéis biocompatíveis. Sendo assim, materiais compostos de NTC e GO podem receber características distintas de alta hidrofília, grande área de superfície específica e propriedades físicas análogas da matriz extracelular, as quais podem facilitar suas aplicações em cultura de células e outras aplicações biomédicas (9).

Atualmente, pesquisas em bioengenharia tecidual com a utilização de nanotecnologia como sistema indutor e controlador na prevenção e tratamento de patologias, se mostra promissor em relação a medicina tradicional, uma vez que a matriz de colágeno pode associar-se facilmente com nanoestruturas como as de carbono. Scaffolds artificiais enriquecidos com carbono estão sendo produzidos para aplicações como liver-on-a-chip e fígado bioartificial (9, 41, 42). Scaffolds biomiméticos à base de carbono se tornaram altamente promissores visto que se tornaram uma alternativa para substituição de animais de pequeno porte em testes de biotransformação de drogas (9, 41, 42).

Neste trabalho, nós funcionalizamos dois nanomateriais à base de carbono, nanotubo de carbono de múltiplas camadas (NTC) e nano óxido de grafeno (nGO), com colágeno tipo I e matriz extracelular de fígado descelularizado (LEM) a fim de aprimorar *scaffolds* para culturas primárias de hepatócitos focando no aumento da viabilidade dos hepatócitos em cultura.

2.1 Objetivo Geral

Produção de *scaffolds* a base de matriz extracelular de fígado funcionalizados com nanomateriais para o cultivo celular

2.2 Objetivos Específicos

- Produção de matriz artificial à base de materiais nanoestruturados com matriz artificial de fígado (LEM);
- Caracterização físico-química dos *scaffolds*;
- Avaliar a biocompatibilidade dos *scaffolds* com HepG2, rOB e hASC;
- Avaliar a viabilidade de células HepG2 nos *scaffolds*;
- Avaliar o potencial osteogênico do *scaffolds*;

3. Material e Métodos

O fluxograma abaixo resume os ensaios realizados neste capítulo da tese.

Caracterização dos Nanomateriais

- ❖ Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)
- ❖ DLS e Potencial Zeta
- ❖ Espectroscopia Raman
- ❖ Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Produção dos scaffolds

- ❖ Descelularização dos fígados
- ❖ Caracterização da descelularização
 - Histologia
 - Concentração de DNA
 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
 - Imunofluorescência
 - Conteúdo de GAGs
- ❖ Padronização da concentração de nanomaterias
 - Viabilidade Celular
- ❖ Funcionalização dos nanomateriais aos scaffolds
 - DLS e Potencial Zeta
 - Espectroscopia Raman
 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)
 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
 - Microscopia de Força atômica (AFM)

Ensaio de citocompatibilidade

- ❖ HepG2
 - Viabilidade Celular
 - Síntese de Albumina
 - Secreção de Uréia
 - Biotransformação de verde de indocianina
- ❖ Hepatócitos de camundongos
 - Viabilidade Celular
 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)
- ❖ Taxa de absorção de colágeno

Manutenção do *Cell Fate*

- ❖ Osteoblastos de ratos Wistar
 - Viabilidade Celular
 - Atividade da fosfatase alcalina
 - Concentração de colágeno
 - Coloração por vermelho de alizarina
 - Coloração por *Von Kossa*

Fluxograma 1. Resumo dos ensaios realizados neste capítulo da tese.

3.1 Preparação da matriz extracelular de fígado descelularizado (LEM)

Camundongos machos (C57bl/6, 4 semanas, n=10) foram anestesiados com xilazina (1,0mg/0,1ml/10g, König, Brasil) e ketamina (0,2mg/0,1ml/10g, Vetnil, Brasil) via intraperitoneal, em seguida, seus fígados foram isolados e lavados com PBS por 10 minutos. Em seguida, os fígados permaneceram em agitação em SDS (1% (p/v)) (Sigma-Aldrich, USA) e inibidor de protease (IP) (Sigma-Aldrich, USA) por 48 horas para remover todos os componentes celulares. O SDS/IP foi trocado de 12 em 12 horas. Após a descelularização dos fígados, a LEM produzida foi dialisada por 48 horas para retirar todo o SDS. Posteriormente, a LEM foi liofilizada e macerada. O pó de LEM resultante foi digerido por 72 horas com pepsina (10% (p/p)) em 1% de ácido acético (Sigma-Aldrich, USA).

3.2 Avaliação da descelularização

Para verificar a eficiência da descelularização foram realizadas análises histológicas e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos fígados nativos e descelularizados. Para as análises histológicas, a LEM e o fígado foram incluídos em Paraplast® (Sigma-Aldrich, USA), seccionados e corados H&E (Leica Biosystems) e com azul de toluidina (Leica Biosystems). Para obter as imagens de MEV, a LEM e o fígado nativo foram fixados com 4 % de glutaraldeído (Sigma-Aldrich, USA), pós-fixados com tetróxido de ósmio (OsO₄) (Sigma-Aldrich, USA), desidratadas em álcool, secas em ponto crítico de CO₂ e metalizadas com ouro. As estruturas e disposição do colágeno nos *scaffolds* foram observadas por imagens de MEV que foram realizadas no FEI Quanta 200 FEG.

Ainda para confirmar a perda total do conteúdo intracelular, o conteúdo de DNA foi extraído usando o kit de extração (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen) e a quantificação do conteúdo de DNA foi mensurada na absorbância de 260nm (Thermo Scientific NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Para determinar a preservação das proteínas constituintes da matriz extracelular, foi realizado ensaios de microscopia de imunofluorescência usando os anticorpos contra colágeno (1:500, Abcam, USA), fibronectina (1:500, Abcam, USA) e laminina (1:500, Abcam, USA). O conteúdo de GAGs foram extraídos de amostras de fígado e LEM segundo o protocolo estabelecido por Frazier et. al (43) e quantificados usando alcian blue (Sigma-Aldrich, USA). A curva padrão utilizada na quantificação do conteúdo de GAG foi realizada utilizando sulfato de condroitina A (Sigma-Aldrich, USA). Ainda para confirmar a preservação de glicosaminoglicanos (GAGs) na

matriz descelularizada, a LEM e o fígado foram incluídos em O.C.T, seccionados e corados com alcian blue.

3.3 Preparação dos *scaffolds*

As fibras de colágeno foram extraídas de tendões das caudas de ratos Wistar e armazenadas em ácido acético 1% à 4°C por 7 dias, seguindo o protocolo estabelecido por Rajan et. al com algumas adaptações (44). Em resumo, após 7 dias, a solução concentrada de colágeno foi centrifugada à 20000g por 2 horas à 4°C. O sobrenadante foi armazenado à 4°C até a construção dos géis. Os nano tubo de carbono (NTC), na concentração de 30ng/mL, e nano óxido de grafeno (nGO), na concentração de 15ng/mL, foram adicionados ao colágeno e levados ao banho ultrassônico por 2 horas. Em seguida, as amostras receberam 1mg/mL de EDC (Sigma-Aldrich, USA), foram levadas ao banho ultrassônico por 10 min e ficaram em agitação por 24 horas à 4°C (45). Em seguida, a solução foi ajustada para a concentração final de 2,0 mg/ml, o pH foi ajustado para 7.4 com 1N de NaOH (Sigma-Aldrich, USA) e a solução foi transferida para a placa de cultura e incubada overnight à 37°C. Os *scaffolds* foram produzidos em ambiente estéril e após a gelificação recebeu banho de U.V. por 15 minutos. Para determinar a concentração ideal de nanomateriais nos *scaffolds*, células de hepatocarcinoma humano (HepG2), células-tronco mesenquimais humanas (hASC) e osteoblastos de ratos Wistar (rOB) foram incubadas por 48 horas com diferentes concentrações dos nanomateriais e a viabilidade foi avaliada pelo ensaio de Alamar Blue®.

***Scaffolds* de Colágeno+LEM+Nanomateriais**

Para a produção dos *scaffolds* de LEM, a matriz foi “crosslinked” com o colágeno, como reportado anteriormente por Aleahmad et. al (46). Em resumo, a LEM foi misturada com colágeno e foi adicionado 5 mM 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC, Sigma-Aldrich, USA) e 2 mM Nhydroxysulfosuccinimide (NHS, Sigma-Aldrich, USA) preparados em 50mM de tampão 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES, Sigma-Aldrich, USA) preparado em etanol 70%, pH 5. Em seguida, a mistura foi armazenada à 4°C por 24 horas. Os NTC e nGO foram adicionados ao colágeno e levados ao banho ultrassônico por 2 horas. Em seguida, as amostras receberam 1mg/mL de EDC, foram levadas ao banho ultrassônico por 10 min e ficaram em agitação por 24 horas à 4°C (45). Em seguida, a solução foi ajustada para a concentração final de 1,0 mg/mL LEM para 2,0 mg/mL Colágeno, o pH foi ajustado para 7.4 com 1N de NaOH e a solução foi transferida para a placa de cultura e incubada overnight à 37°C. Os *scaffolds* foram produzidos em ambiente

estéril e após a gelificação receberam banho de U.V. por 15 minutos. As concentrações de nanomateriais foram iguais as concentrações utilizadas nos géis de colágeno.

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises de MET os NTCs e nGO foram diluídos em água Milli-Q, tendo a concentração de 300 µg/mL. Após o preparo, as soluções foram gotejadas em telas de cobre Holey carbon de 400 mesh (5 gotas). Após a secagem das telas, as mesmas foram armazenadas em estojos próprios e levadas para análise em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-20-FEI 2006.

3.5 Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) e Potencial Zeta

O tamanho e o potencial Zeta dos nanotubo de carbono e óxido de grafeno foram determinados em água e meio basal (meio de cultura DMEM (Gibco) (pH = 7,4) suplementado com 10% de SFB (Gibco)) pela técnica de Espalhamento Dinâmico da Luz (Zetasizer Nano ZN; Malvern Instruments Ltd, Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

3.6 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos usando um FT-Raman Espectrômetro RFS / 100 (Bruker) usando uma excitação Nd: YAG laser com $\lambda = 1064$ nm. Os espectros foram registrados no intervalo espectral de 3500 a 50 cm^{-1} em uma resolução espectral de 4 cm^{-1} . As análises otimizadas foram obtidas com uma potência laser de 100mW e 512 acumulações. Os espectros Raman foram obtidos em triplicata para avaliar a intensidade e posição das bandas observadas.

3.7 Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Alpha Bruker FTIR através de um acessório de refletância total atenuada (ATR) de cristal de diamante. As medidas foram realizadas no modo transmissão na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , empregando resolução de 4 cm^{-1} e 256 acumulações.

3.8 Microscopia de Força Atômica

As amostras foram preparadas pelo método spread coating, sendo depositadas em substratos de vidro (1,0 x 1,0 cm) devidamente higienizados e, em seguida, secas com gás inerte (N_2). As análises foram realizadas em um microscópio modelo Nanoscope IV MultiMode SPM (Bruker Instruments), em umidade e temperatura ambiente, no modo Peak

Force QNM. Para isso, utilizou-se uma sonda modelo NSC36 (MikroMasch) com frequência natural de oscilação $\omega_0 = 65$ kHz e constante elástica $k = 0,6$ N.m⁻¹. Todas as medidas foram efetuadas no Laboratório de Nanoscopia (coordenado pelo Prof. Dr. Bernardo R. A. Neves/ Departamento de Física – UFMG). O software Nanoscope foi utilizado para processamento e análises de imagens.

3.9 Cultura primária de hepatócitos

Camundongos machos (C57bl/6, 12 semanas, n=4) foram anestesiados com xilazina (1,0mg/0,1ml/10g, Konig, Brasil) e ketamina (0,2mg/0,1mL/10g, Vetnil, Brasil) via intraperitoneal e, em seguida, a veia porta foi exposta, após o animal parar de responder à estímulos nocivos. A veia porta dos animais foram canuladas com agulha de perfusão calibre 22G a uma taxa de fluxo de 5 mL / min com 50 mL tampão de perfusão I (0,1% de D-glicose, 0,5mM EGTA, 120 mM NaCl, 5mM, KCl, 0,4mM KH₂PO₄, 0,2mM Na₂HPO₄, 62,5mM NaHCO₃) pré-aquecido à 37°C. Em seguida, os fígados foram perfundidos com 50 mL do tampão de perfusão II (0,1% de D-glicose, 0,5mM EGTA, 120 mM NaCl, 5mM, KCl, 0,4mM KH₂PO₄, 0,2mM Na₂HPO₄, 62,5mM NaHCO₃, 1mM MgSO₄, 1,25mM MgCl₂, 7,5mM CaCl₂) com 4% de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich, USA). Em seguida, o fígado foi retirado com muito cuidado, dissecado em meio William's Medium E (Sigma-Aldrich, USA) completo. As células foram filtradas em filtro de 40µM, as células foram suspensas em meio Williams' completo, centrifugadas a 40xg durante 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em meio Williams' completo e plaqueadas nos *scaffolds* (47).

3.10 Testes de biocompatibilidade

3.10.1 Verde de Indocianina (ICG)

Para avaliar a funcionalidade das células HepG2, o *Indocyanine Green* (ICG) (Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em água, a uma concentração de 1 mg/mL. Nos dias de ensaios, o reagente foi adicionado ao meio de cultura em uma concentração final de 100 µg/mL e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PSB e levadas ao microscópio óptico, para captura das imagens.

3.10.2 Síntese de Ureia

A função das células HepG2 foi avaliada através da síntese de ureia. Para isso, 100 µL do meio de cultura foram retirados das células nos dias de ensaio e armazenados no -80 °C.

Foi utilizado o Kit Ureia CE (Labtest Diagnóstica), com algumas adaptações das recomendações do fabricante. Para realizar o ensaio, 100 µL de meio de cultura foram incubados com o 100 µL de Urease Tamponada (urease: tampão fosfato 10 mmol/L, EDTA 6 mmol/L e urease 268 KU/L. Tampão da urease: tampão fosfato 100 mmol/L pH 6,9, salicilato de sódio 312 mmol/L, nitroprussiato de sódio 16,8 mmol/L) a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, a amostra foi incubada com Oxidante (hidróxido de sódio 2,8 mol/L e hipoclorito de sódio 121 mmol/L) a 37 °C durante 5 minutos. Posteriormente, a absorbância foi mensurada a 600 nm em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®).

3.10.3 Secreção de Albumina

A função das células HepG2 foi avaliada através da secreção de albumina. Para isso, 1 mL do meio de cultura foi retirado das células nos dias de ensaio e armazenados no -80 °C. Foi utilizado o Kit Albumina (Labtest Diagnóstica), com algumas adaptações das recomendações do fabricante. Para realizar o ensaio, 100 µL de meio de cultura foram incubados com 100 µL de Reagente de Cor (tampão 60 mmol/L, pH 3,8, verde de bromocresol 300 µmol/L e Brij 35 \geq 6,0 mmol/L), durante 2 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device®) em uma absorbância de 620 nm.

3.10.5 Análises microscópicas

Após 24 horas de cultura, os hepatócitos foram fixados com 4% de glutaraldeído (Sigma-Aldrich, USA), pós-fixados com OsO₄ (Sigma-Aldrich, USA), desidratadas em álcool, secas em ponto crítico de CO₂ e metalizadas com ouro. As estruturas e disposição dos hepatócitos nos *scaffolds* foram observadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) que foram realizadas no FEI Quanta 200 FEG.

3.11. Análises estatísticas

Todos os dados quantitativos foram representados pela média \pm o desvio padrão. A significância estatística foi determinada usando o teste t de Student't não pareado e o teste ANOVA utilizando-se GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, Software GraphPad, La Jolla California, USA.

4. Resultados

4.1 Caracterização dos Nanomateriais à base de carbono

Para caracterizar os nanomateriais à base de carbono (NTC e nGO) foram realizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nGO e do NTC. A MET dos nGOs (Figura 3A) demonstrou a morfologia de um grão do pó constituído por nanofolhas de GO altamente aglomeradas na forma de flocos e, de acordo com Tang et al. (48), a amostra apresenta características morfológicas típicas de nGO. Na imagem dos NTCs (Figura 3B) observamos o enrolamento de vários planos de átomos de carbono dispostos concêntricamente e a luz dos tubos em coloração mais clara e, desta forma, caracterizamos os NTCs, morfológicamente e estruturalmente, como nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNTC) (49).

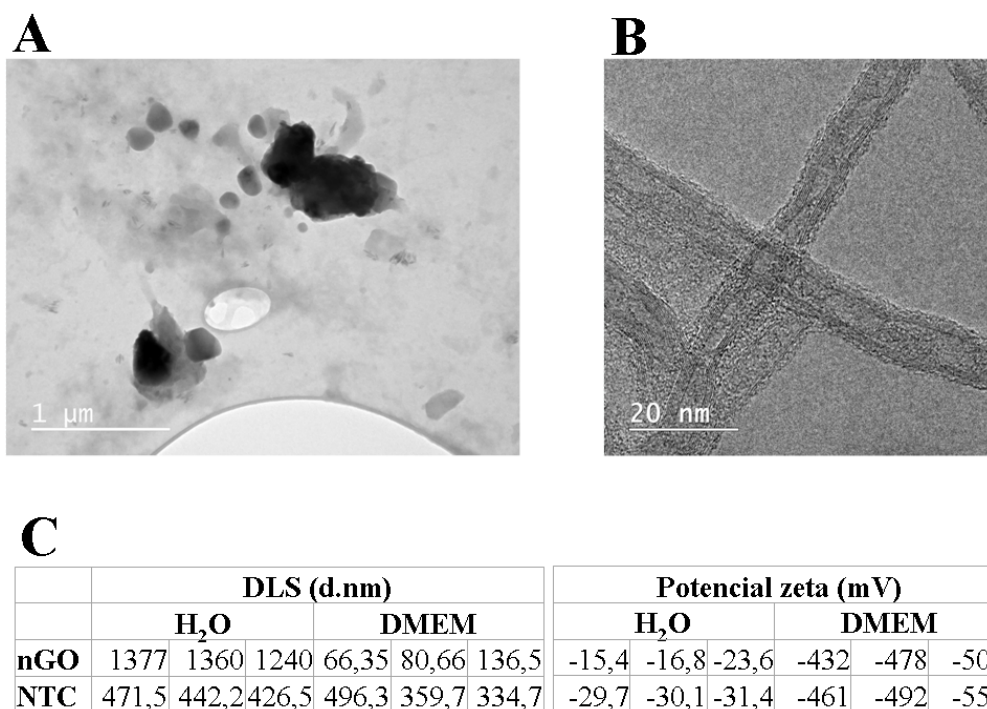


Figura 3. Caracterização dos nanomateriais. A. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nGO. B. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do NTC.

Em água, os nGO apresentam $1325,66 \pm 74,67$ (n=30) nm de diâmetro e potencial zeta de $-18,6 \pm 4,38$ (n=3) mV. Já os NTCs apresentam $446,73 \pm 22,84$ (n=3) nm de diâmetro e potencial zeta de $-30,4 \pm 0,88$ (n=3) mV. Em meio basal (meio DMEM + 10% SFB), os nGO apresentam $94,50 \pm 37,07$ (n=3) nm de diâmetro e potencial zeta de $-472 \pm 38,28$ (n=3) mV. Já os NTCs apresentam $396,9 \pm 86,99$ (n=3) nm de diâmetro e potencial zeta de $-503 \pm 48,99$ (n=3) mV (Figura 3C).

Finalizando a caracterização dos nanomateriais, foi realizada a espectroscopia Raman e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Como pode ser observado na figura 4, o nGO (em cinza) apresenta modos vibracionais evidentes na faixa de, 1580 cm^{-1} e em 1315 cm^{-1} , respectivamente. Os NTCs (em preto) também apresentam dois modos vibracionais na faixa de, 1596 cm^{-1} e em 1307 cm^{-1} , respectivamente (Figura 4).

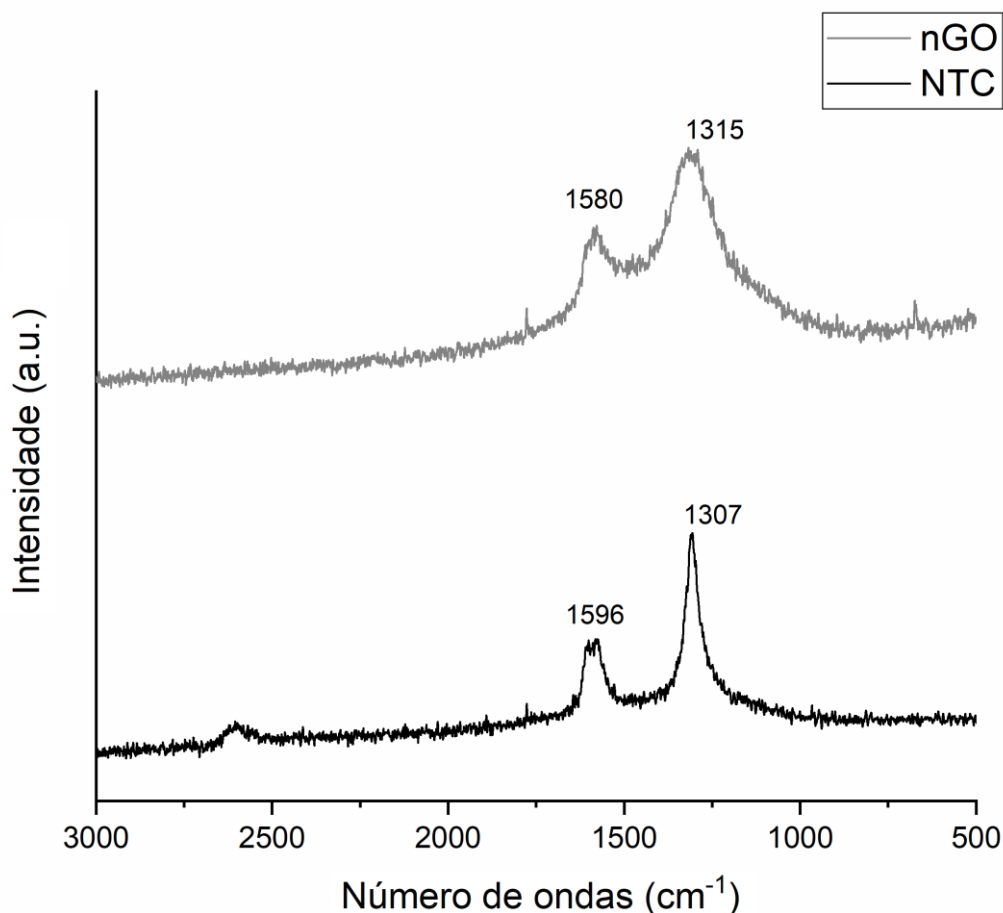


Figura 4. Caracterização dos nanomateriais. Espectroscopia Raman dos nGO (em cinza) e dos NTC (em preto).

Em consonância aos resultados obtidos na microscopia Raman, quando analisadas pela FTIR, os alótropos do carbono apresentaram modos vibracionais compatíveis com os nGO e NTC (Figura 5). Os nGO apresentam modos vibracionais evidentes na faixa de 3186 cm^{-1} , 1719 cm^{-1} , 1586 cm^{-1} , 1399 cm^{-1} , 1034 cm^{-1} e 581 cm^{-1} . As NTC apresentam três modos vibracionais característicos desse alótropo do carbono: 3316 cm^{-1} , 1117 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} .

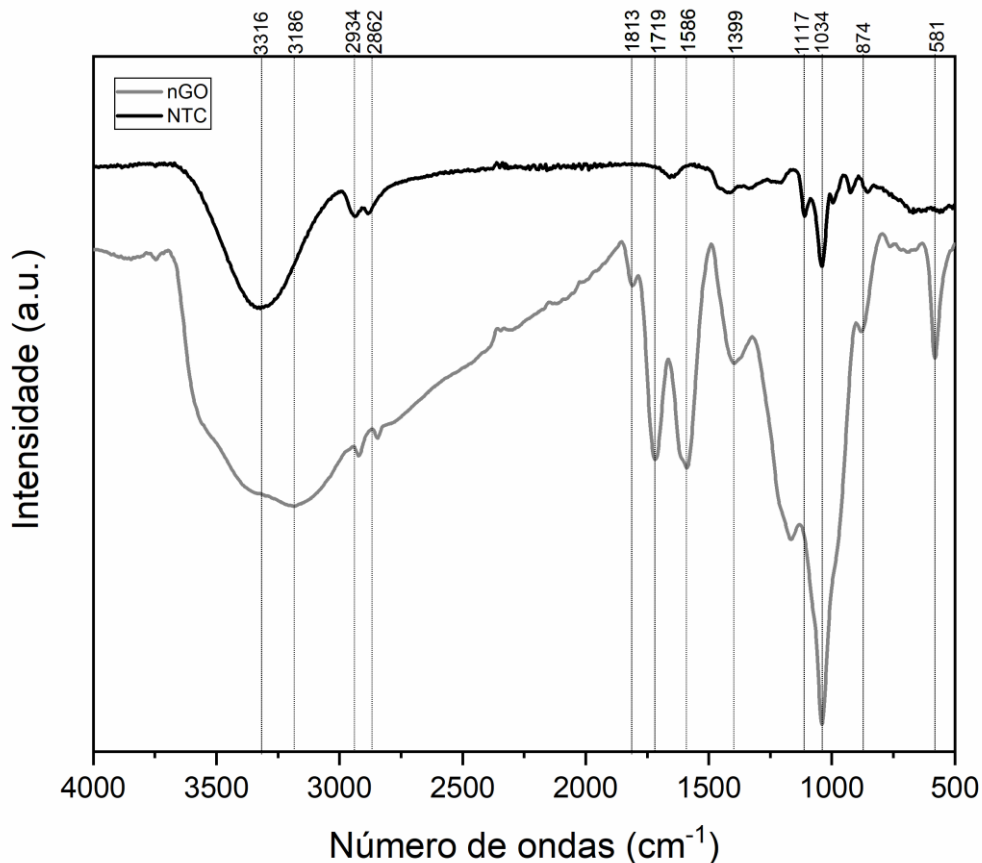


Figura 5. Caracterização dos nanomateriais. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos nGO (em cinza) e dos NTC (em preto).

A espectroscopia Raman é uma técnica que permite diferenciar os alótropos do carbono. É possível visualizar regiões bem definidas no espectro Raman nas amostras de NTC (50, 51). O espectro dos NTC evidenciam duas bandas característica desse nanomaterial, a banda G, próxima de 1580 cm^{-1} , que é associada a nanotubos perfeitos e a banda D, próxima de 1350 cm^{-1} , que é atribuída à presença de estruturas desordenadas nos NTC e carbono amorfo (50). A banda G é comum em todas as formas de carbono sp^2 e, por isso, podemos encontrá-la em ambos nanomateriais (52). A banda D é encontrada quando há a presença de uma desordem na estrutura do carbono aromático (48, 51). Nas amostras de nGO, é esperado encontrarmos esse tipo de banda pois, os carbonos sp^2 são modificados recebendo grupos funcionais contendo oxigênio em sua estrutura. Já a presença da banda D nas amostras de NTC pode ser justificada pela técnica utilizada durante a síntese dos NTC, na qual ocorre um processo de carboxilação dos NTC. Além do mais, Heise et al. (53), comparando comprimentos de onda na magnitude de 532nm e 785nm observam diferenças na amplitude dos picos da banda G presentes nos MWNTC analisados e alertam a importância especificar o comprimento de onda na qual as amostras foram avaliadas (53).

A Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier é uma técnica que nos permite estudar a região vibracional de compostos que contenham ligações covalentes. Nossos dados mostraram um sinal em 3316 cm^{-1} nas NTCs e este é atribuído ao alongamento dos grupos hidroxila (OH). Os sinais 2934 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento assimétrico e simétrico de grupos CH_2 . Os sinais 1117 cm^{-1} e 1034 cm^{-1} são atribuídos as ligações entre C-C e C-O (54, 55).

Nas nGO podemos observar um sinal em 3316 cm^{-1} e 3186 cm^{-1} , atribuídos ao alongamento dos grupos OH e CH_2 , respectivamente. Os sinais 2934 cm^{-1} e 2862 cm^{-1} são atribuídos ao estiramento assimétrico e simétrico de grupos CH_2 . O sinal em 1719 cm^{-1} pode ser atribuído ao alongamento dos grupos carbonila (C = O). Os sinais entre 1586 e 1399 cm^{-1} são atribuídos ao alongamento simétrico dos grupos carboxila (COOH), à flexão do OH e ao movimento dos grupos CH. Os sinais 1034 cm^{-1} e 581 cm^{-1} são atribuídos as ligações entre C-C e C-O (54, 55).

4.2 Avaliação da descclularização

A descclularização foi finalizada quando os fígados se encontravam translúcidos (Figura 6A). Para verificar a eficiência da técnica, o fígado nativo e a matriz descclularizada foram corados com H&E e azul de toluidina. Nos cortes corados com H&E há uma forte coloração por hematoxilina nos fígados nativos enquanto não há presença da coloração por hematoxilina nos fígados descclularizados (Figura 6A). O mesmo acontece para a coloração com azul de toluidina (Figura 6A). O conteúdo de DNA foi quantificado em 1,4% (n=3) em relação ao fígado nativo (100%, n=3), confirmando mais uma vez a eficiência da descclularização (Figura 6B). As imagens de MEV do fígado nativo demonstra a presença de células esferóides envoltas por matriz extracelular escassa enquanto os fígados descclularizados apresentam apenas complexa rede estrutural e ausência de formas esferóides semelhantes as células presentes no fígado nativo (Figura 6C). A coloração por imunofluorescência contra as proteínas de matriz extracelular colágeno I, fibronectina e laminina, contrastadas com a marcação nuclear DAPI demonstraram que após a descclularização dos fígados, as proteínas de matriz se mantiveram preservadas e apresentaram marcação DAPI-negativos, confirmando a ausência de células na matriz extracelular (Figura 6C). Em conjunto, esses dados mostram a eficiência na técnica de descclularização, ausência de componentes celulares, baixa quantidade de DNA nas amostras de fígado descclularizado e preservação de proteínas da matriz extracelular. O conteúdo de

GAGs foi quantificado em 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) apresentando-se significativamente menor que nos fígados nativos 8,31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$), confirmando a preservação dos GAG, ainda em pequena quantidade (Figura 6D). Ainda para confirmar a preservação dos GAGs, os cortes de fígados nativos e descelularizados demonstraram coloração positiva para alcian blue (Figura 6E).

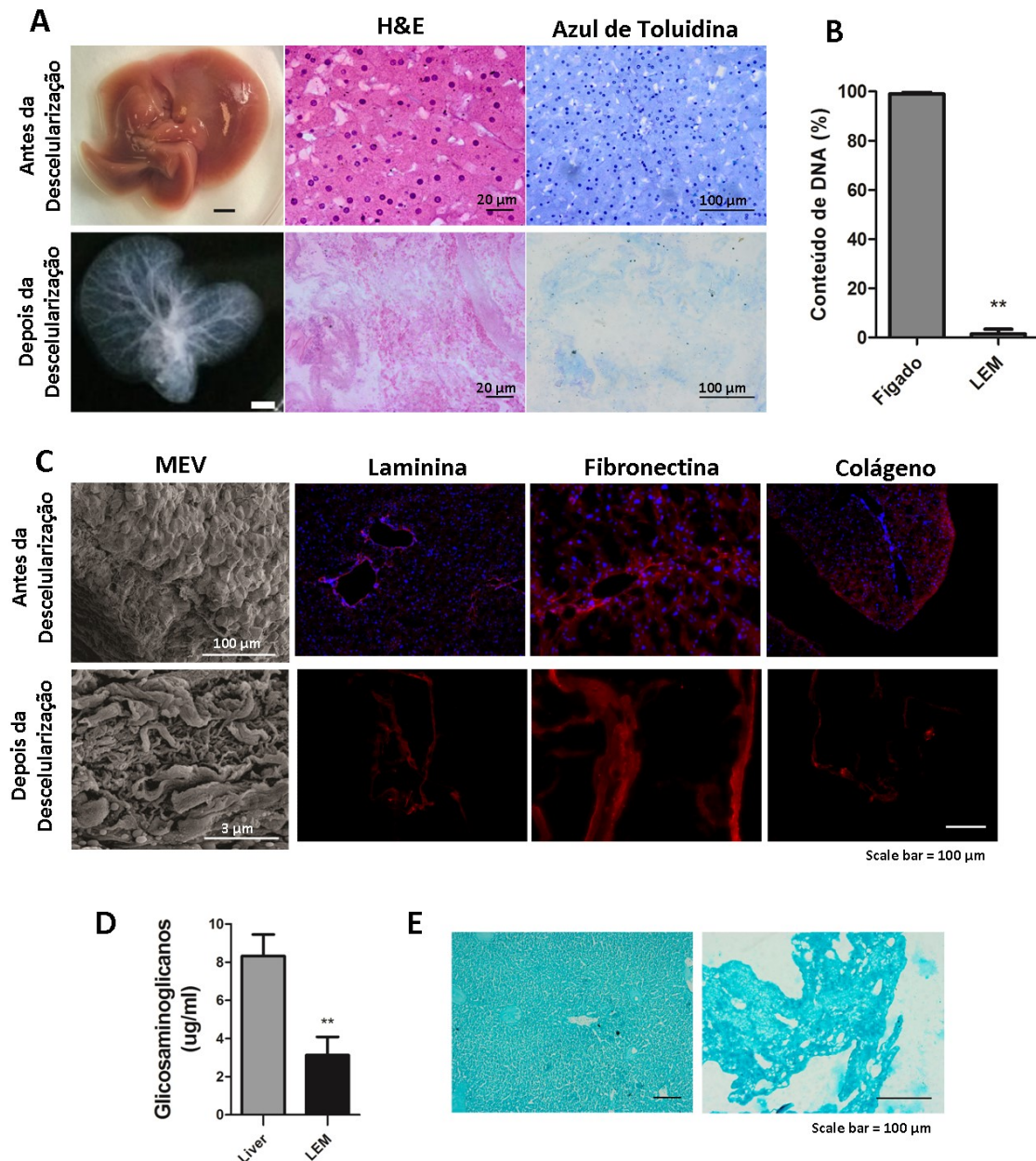


Figura 6. Caracterização da descelularização. **A.** Aspecto macroscópico do fígado antes e após a descelularização (esquerda). Coloração por H&E (meio) e azul de toluidina (direita). **B.** Conteúdo de DNA Foi aplicado o teste t de Student't não pareado ($n=3$; $**p<0,05$). **C.** Imagens de MEV e imunofluorescência. **D.** Conteúdo de GAGs. Foi aplicado o teste t de Student't não pareado ($n=3$; $**p<0,05$). **E.** Coloração Alcian Blue.

4.3 Preparação e caracterização dos *scaffolds*

A extração do colágeno foi realizada conforme protocolo estabelecido por Rajan e colaboradores (44), detalhado anteriormente. A solução obtida apresentou uma concentração de 5,4mg/mL e foi armazenada em 4°C até a produção dos *scaffolds* (Figura 7A). Para verificar a eficiência da extração, foi realizada uma eletroforese em gel de gradiente (10% a 15%) de poliacrilamida, utilizando-se os colágenos de boi, camundongo e comercial como comparativos (Figura 7D). Observou-se que os colágenos apresentam um padrão de bandeamento entre 130 e 100kDa. Ao comparar os colágenos de camundongo e de rato, utilizado nos experimentos deste trabalho, com o colágeno comercial, podemos observar uma preservação de bandas semelhantes, apesar do colágeno utilizado apresentar bandas mais evidentes.

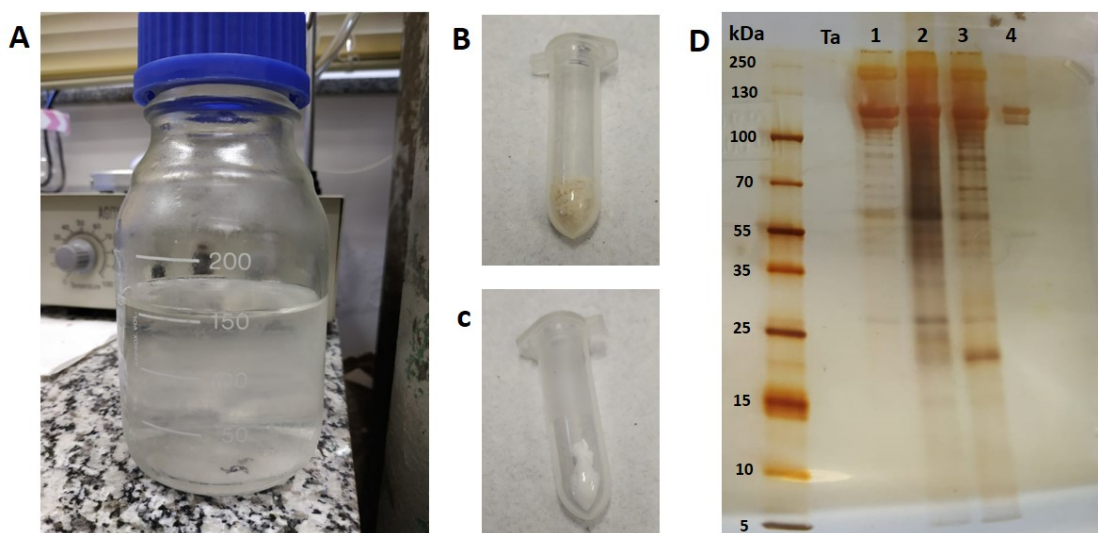


Figura 7. Caracterização do colágeno. A. Solução de colágeno após a extração do rabo de rabo e centrifugação. B. Matriz extracelular de fígado liofilizada. C. Solução de colágeno liofilizada. D. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de diferentes colágenos em coloração de nitrato de prata. Ta: tampão da amostra, 1 – colágeno comercial, 2 – colágeno de rato, 3 – colágeno de camundongo e 4 – colágeno de boi.

A fim de determinar a concentração ideal dos nanomateriais, $1,0 \times 10^3$ células-tronco mesenquimais humanas (hASC), $1,0 \times 10^3$ células HepG2 e $1,0 \times 10^3$ osteoblastos de rato foram plaqueadas em diferentes concentrações de *scaffolds* funcionalizadas com os nanomateriais. Após 48 horas foi verificada a viabilidade dos três tipos celulares em *scaffolds* de colágeno funcionalizados com nGO, em concentrações variantes de 0ug/mL a 30 ug/mL do nanomaterial e com NTC, em concentrações de 1ug/mL a 50ug/mL.

Não foi observado diferenças significativas na viabilidade das hASC cultivadas com as diferentes concentrações de nGO quando comparadas aos grupo controle (Figura 8A). Não foi observado diferenças significativas na viabilidade das HepG2 cultivadas com as diferentes concentrações de nGO quando comparadas aos grupo controle (Figura 8B). Os osteoblastos cultivados com 15ug/mL de nGO apresentaram maior viabilidade celular ($115,6\% \pm 1,8$; $n=4$, $*p<0,05$) quando comparados aos controles (100%; $n=4$). Na concentração de 30ug/mL, os nGO foram citotóxicos para os osteoblastos ($93,15\% \pm 1,876$; $n=4$, $**p<0,05$) (Figura 8C). Observado os resultados em conjunto, foi determinado a utilização dos nGO em uma concentração de 15ug/mL.

As hASC cultivadas com 30ug/mL ($147,4\% \pm 20,74$; $n=4$, $**p<0,05$) e 50ug/mL ($138,8\% \pm 12,63$; $n=4$, $**p<0,05$) de NTC apresentaram maior viabilidade celular quando comparados aos controles (100%; $n=4$) (Figura 8A). As HepG2 cultivadas com 50ug/mL ($110,7\% \pm 8,58$; $n=4$, $*p<0,05$) de NTC apresentaram maior viabilidade celular quando comparados aos controles (100%; $n=4$) (Figura 8B). Não foi observada diferenças significativas na viabilidade dos rOB cultivadas com as diferentes concentrações de NTC quando comparados aos grupo controle (Figura 8C). Observado os resultados em conjunto, foi determinada a utilização dos NTC em uma concentração de 30ug/mL.

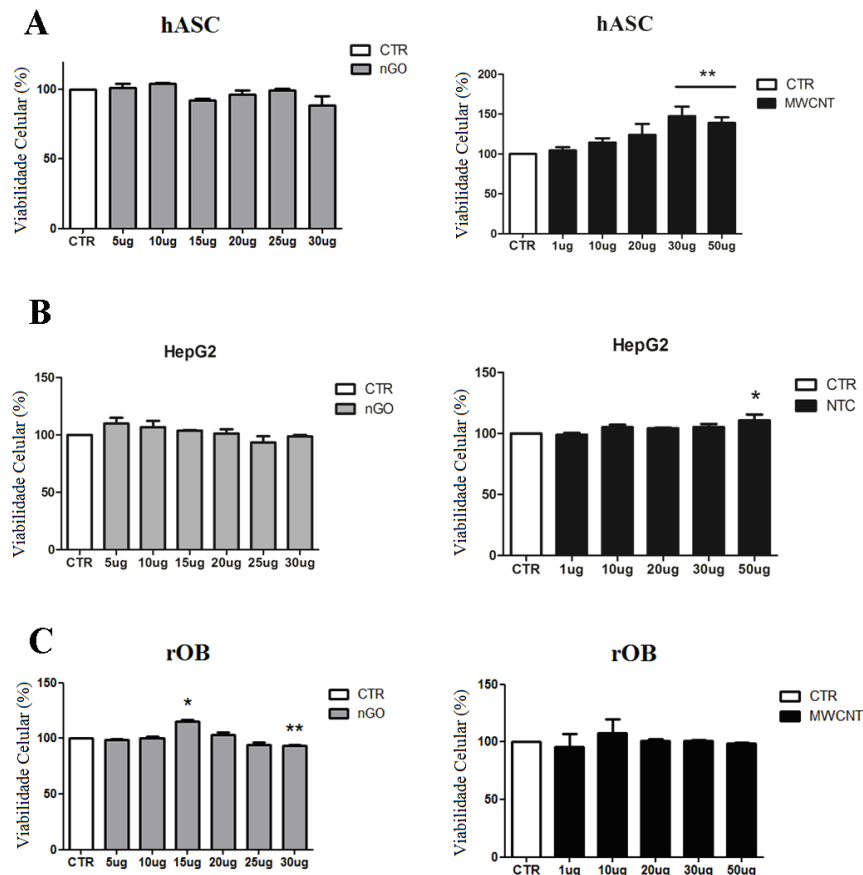


Figura 8. Padronização da concentração de nanomateriais. **A.** Padronização da concentração dos nanomateriais nGO e NTC em hASC. **B.** Padronização da concentração dos nanomateriais nGO e NTC em HepG2. **C.** Padronização da concentração dos nanomateriais nGO e NTC em rOB. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test ($n=4$; $p<0,05$). *: significativamente maior que o controle; **: significativamente menor que o controle.

Após estabelecido a concentração ideal de nanomateriais, os *scaffolds* foram produzidos nas concentrações estabelecidas e caracterizados. Primeiramente, foram realizados novos ensaios de espectroscopia RAMAN (Figura 9) e FT-IR (Figura 10) para verificar se houve a funcionalização dos nanomateriais às proteínas do colágeno e da LEM.

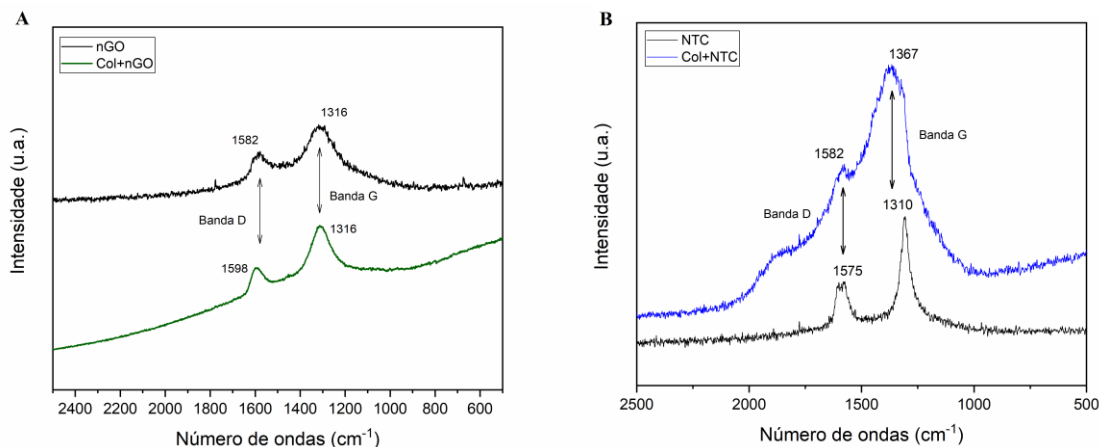


Figura 9. Caracterização dos scaffolds funcionalizados com os nanomateriais. Espectroscopia Raman dos scaffolds de **A.** colágeno+nGO (em verde) e **B.** colágeno+NTC (em azul). Os controles nGO e NTC podem ser observados em cinza e em preto, respectivamente.

Após a funcionalização, nas amostras col+nGO podemos observar um aumento na intensidade do espectro atribuído ao alongamento dos grupos OH e CH₂ identificados pelo sinal 3316 cm⁻¹ e 3186 cm⁻¹, respectivamente, que se encontram agudos enquanto que nas amostras col+LEM+nGO não foi possível detectá-lo. O sinal em 1719 cm⁻¹ se encontra mais intenso, estreito e ligeiramente deslocado nas amostras col+nGO enquanto que nas amostras col+LEM+nGO se encontra com pouca intensidade e também ligeiramente deslocado. Esse sinal, geralmente é atribuído ao alongamento dos grupos carbonila (C = O). Os sinais entre 1600 e 1200 cm⁻¹ são atribuídos ao alongamento simétrico dos grupos carboxila (COOH), à flexão do OH e ao movimento dos grupos CH. Esses sinais podem ser observados em maior intensidade nas amostras col+ nGO, em contrapartida não são conservados na amostra col+LEM+nGO (54, 55) (Figura 10B).

Após a funcionalização podemos observar o alargamento do sinal 3319 cm⁻¹, que se apresenta mais intenso, nas amostras col+NTC e col+LEM+NTC. Esse sinal é atribuído ao estiramento assimétrico e simétrico de grupos CH₂, e indica que o NTC receber mais modificações desta natureza após a funcionalização. Os sinais 1117 cm⁻¹ e 1034 cm⁻¹ são mais intensos e agudos após a funcionalização e esses sinais são atribuídas às ligações entre C-C, C-N e C-O (54, 55) (Figura 10B).

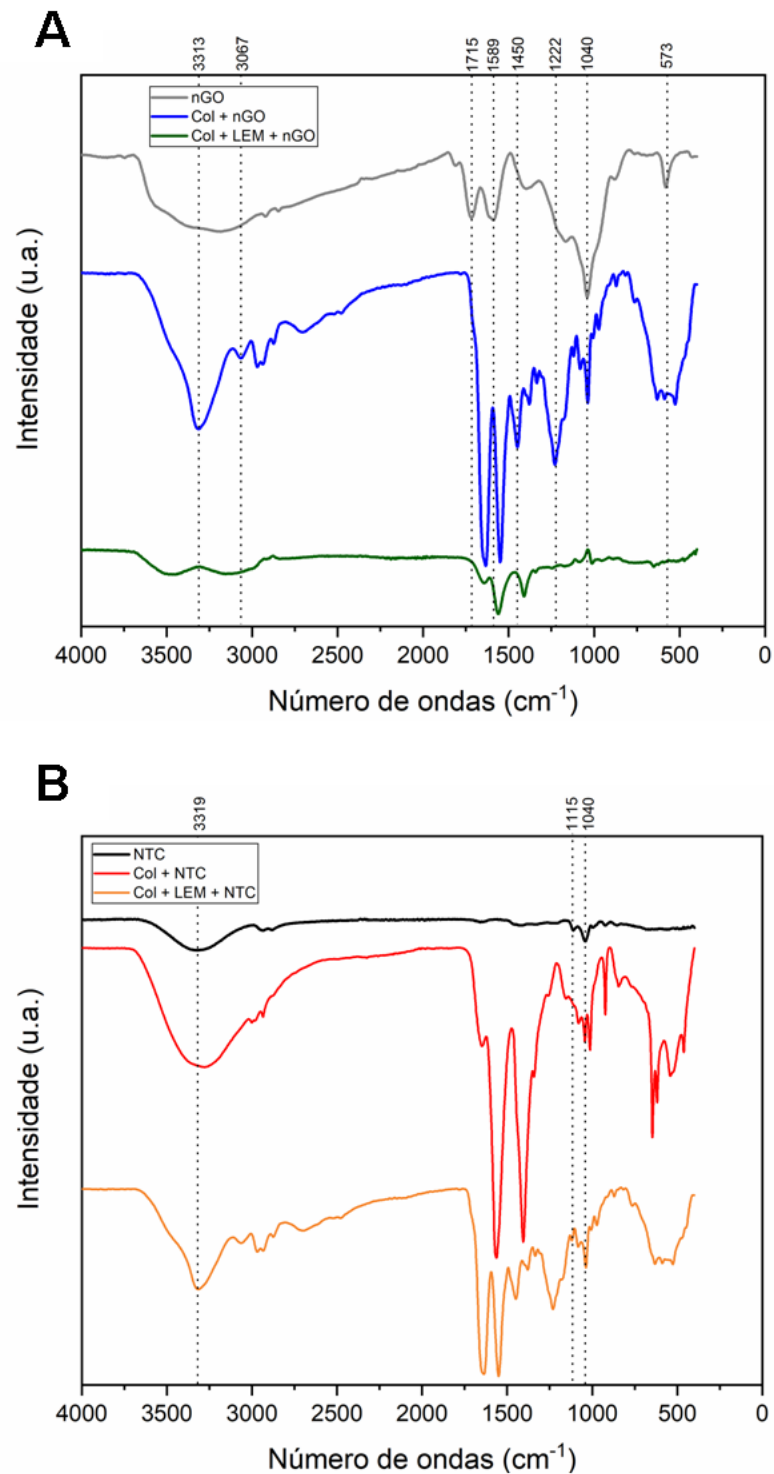


Figura 10. Caracterização dos *scaffolds* funcionalizados com os nanomateriais. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos *scaffolds* de **A.** colágeno+nGO (em azul), colágeno+LEM+nGO (em verde) e **B.** colágeno+NTC (em vermelho) e colágeno+LEM+NTC (em laranja). Os controles nGO e NTC podem ser observados em cinza e em preto, respectivamente.

Também foram realizadas novas medidas de potencial zeta. Os nGO funcionalizados ao colágeno apresentaram potencial zeta de $-19,56 \pm 1,42$ (n=3) mV. Quando funcionalizados

com colágeno+LEM apresentaram potencial zeta de $-18,10 \pm 0,52$ (n=3) mV. Os NTC funcionalizados ao colágeno apresentaram potencial zeta de $-19,40 \pm 3,38$ (n=3) mV. Quando funcionalizados com colágeno+LEM apresentaram potencial zeta de $-23,50 \pm 0,88$ (n=3) mV.

Após gelificados, os géis foram fixados e preparadas para as análises de MEV, para observar a estrutura interna dos *scaffolds*. Foi observada uma diferença visível entre os *scaffolds* de colágeno puro em relação aos *scaffolds* de colágeno funcionalizados com os nanomateriais. As nanofibrilas dos *scaffolds* de colágenos se apresentaram mais espessas e compactadas enquanto os *scaffolds* de colágeno funcionalizados com os nanomateriais apresentaram as nanofibrilas mais finas e menos compactadas (Figura 11).

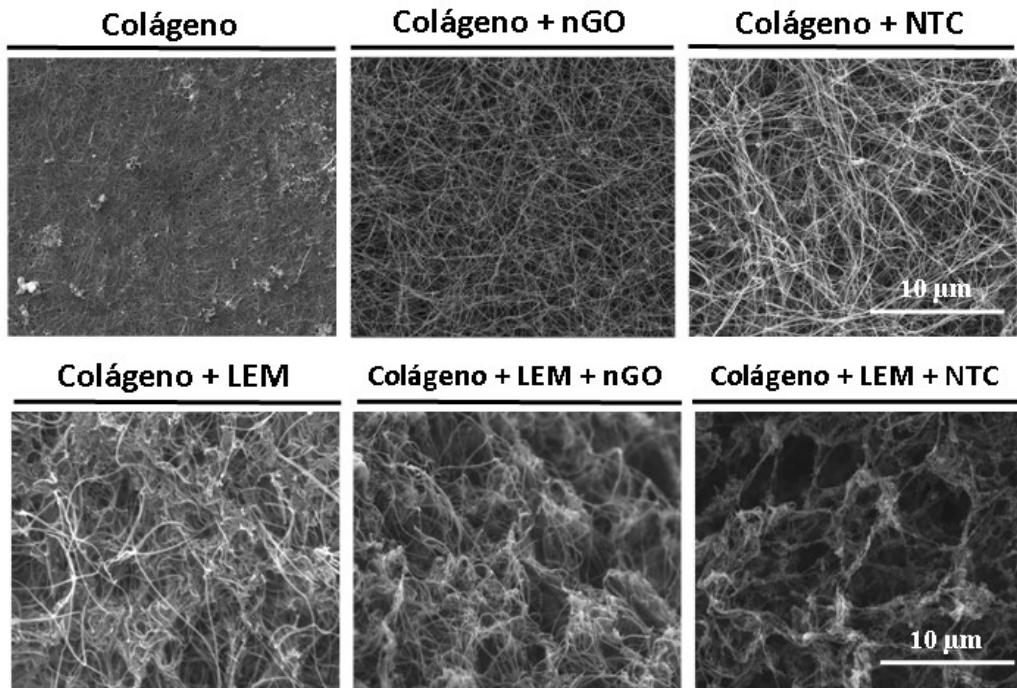
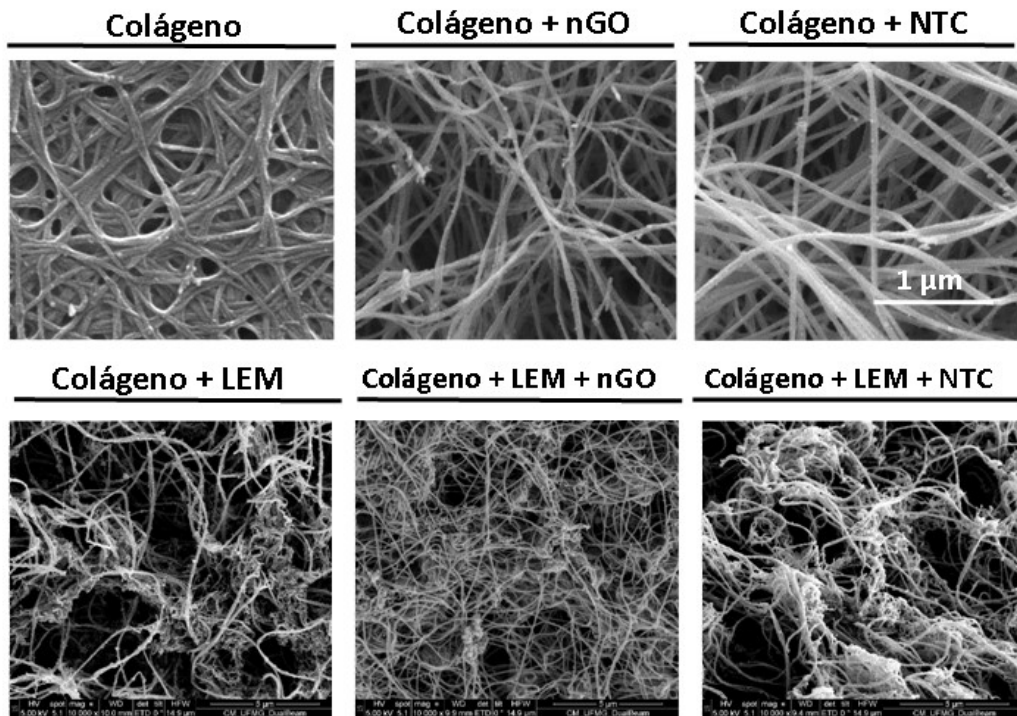
A**B**

Figura 11. Imagens de MEV de nanofibras de colágeno funcionalizadas com nGO e MWNTC em *scaffolds* de colágeno. **A.** Imagens com aumentos entre 1000 a 1500x. **B.** Imagens com aumentos de 10000x.

Além do mais, foi realizada a microscopia de força atômica (AFM) dos *scaffolds* (Figura 12). Nossos dados corroboram com os dados da literatura (56) mostrando o colágeno como uma estrutura semelhante a um tubo, as moléculas de colágeno estão altamente reticuladas e dispostas de forma desordenada (Figura 12). Nas amostras de colágeno funcionalizados com nGO e NTC observamos o mesmo padrão de organização das fibras de colágeno, contudo estas se apresentam mais espessas e com maior altura, devido à presença dos nanomateriais adsorvidos nas fibrilas de colágeno. Podemos observar também a presença de regiões em maior relevo (acima de 30 nm) e possivelmente se trata dos nanomateriais agregados e não funcionalizados nas fibrilas de colágeno (Figura 12).

Nas amostras de colágeno+LEM, temos a presença de proteínas da matriz extracelular de fígados descclularizados e desta forma, é possível observar a presença de pontos mais elevados e bem dispersos na amostra misturados as fibrilas de colágeno. Nas amostras de colágeno+LEM+nGO e colágeno+LEM+NTC observamos o mesmo padrão de organização das fibras de colágeno (semelhante a um tubo), mais espessas e com maior altura que as fibras de colágeno puro além da presença de nanomateriais agregados e não funcionalizados nas fibrilas de colágeno (Figura 12).

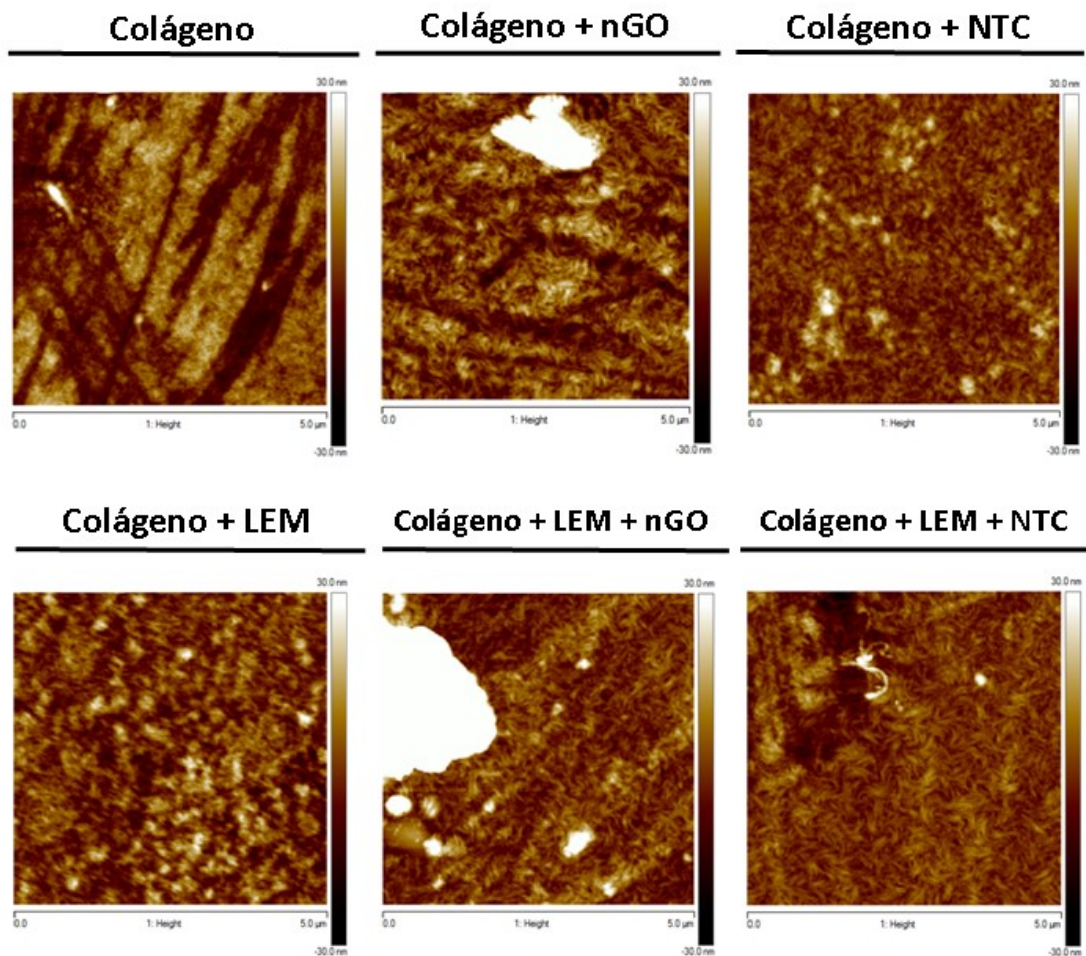


Figura 12. Microscopia de força atômica (AFM) dos *scaffolds* puros e funcionalizados com nanomaterias.

Após caracterizados, a citotoxicidade dos *scaffolds* funcionalizados produzidos foi verificada (Figura 13). A viabilidades das hASC cultivadas nos *scaffolds* de colágeno+LEM funcionalizados com nGO foram significativamente menor quando comparadas as células cultivadas nos *scaffolds* de colágeno puro durante 12, 24 e 48 horas (Figura 13A). Em consonância, durante todo o experimento, a viabilidade das HepG2 cultivadas nos *scaffolds* de colágeno+LEM funcionalizados com nGO foram significativamente menor quando comparadas as células cultivadas nos *scaffolds* de colágeno puro (Figura 13B). Esses dados indicam que os *scaffolds* de colágeno+LEM funcionalizados com nGO são instáveis em cultura e citotóxicos para este modelo celular.

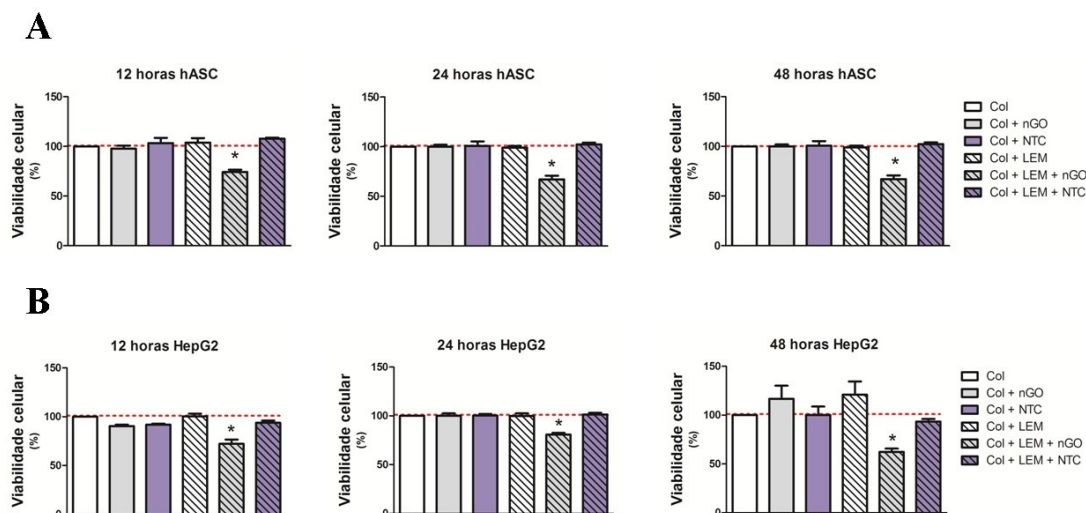


Figura 13. Análise da viabilidade celular dos modelos celulares A. hASC e B. HepG2 semeados nos *scaffolds* de colágeno e colágeno+LEM funcionalizados com os nanomateriais. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0,05$. *: significativamente menor que o col.

A fim de investigar o potencial hepatogênico desse material, novos ensaios foram realizados com células HepG2 e com hepatócitos de camundongos C57/B16.

Cultura de linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2)

Em seguida foi testada a viabilidade dos *scaffolds* (colágeno e colágeno+LEM) funcionalizados com nanomateriais como substrato de revestimento para culturas de hepatócitos utilizando o modelo celular de hepatocarcinoma humano (HepG2). Os *scaffolds* de colágeno puro foram utilizados como controles, já que são utilizados em larga escala como revestimento para culturas de hepatócitos primários. Não foi encontrada diferença significativa na viabilidade dos HepG2 cultivados sobre os *scaffolds* funcionalizados após 7 dias de cultivo (Figura 14A). Não há diferenças significativas na secreção de albumina pelos HepG2 cultivados sobre os *scaffolds* funcionalizados após o 7º dia de cultivo (Figura 14B). O fígado é o único órgão responsável pela produção da albumina, uma proteína circulante no organismo muito importante para o transporte de substâncias pelo sangue. Em contrapartida, as HepG2 cultivadas sobre os *scaffolds* de colágeno funcionalizados com nGO e NTC, respectivamente, apresentaram menor síntese de uréia quando comparados as HepG2 cultivadas sobre os *scaffolds* de colágeno puro (Figura 14C).

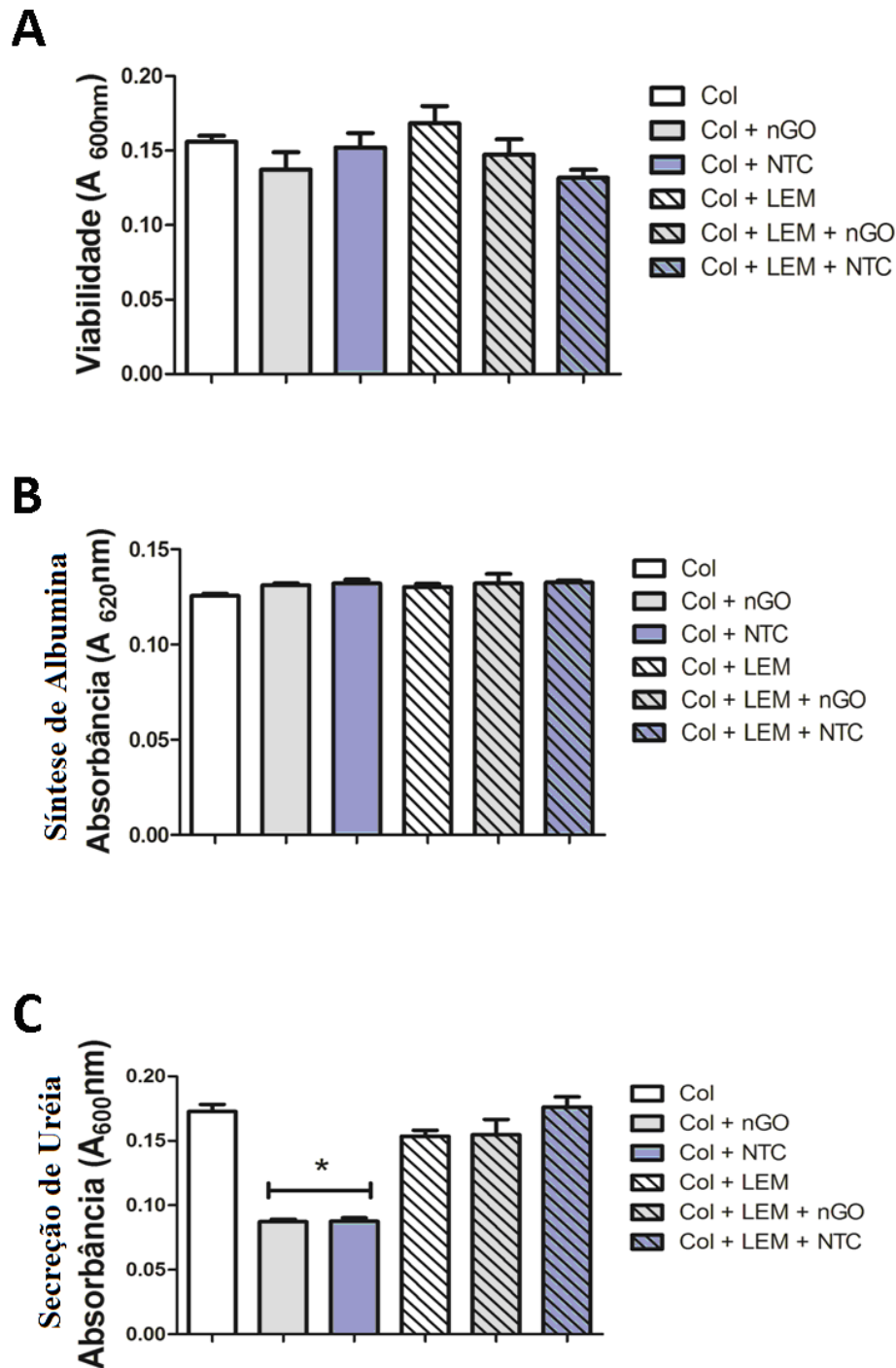


Figura 14. Cultura de linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). **A.** Viabilidade de HepG2 cultivados nos *scaffolds* após 7 dias. **B.** Síntese de albumina pelas HepG2 cultivados nos *scaffolds* após 7 dias. **C.** Secreção de uréia pelas HepG2 cultivados nos *scaffolds* após 7 dias. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, (n=6; *p<0,05). *significativamente menor que o col.

Para avaliar a função excretora das células HepG2 foi utilizado o corante verde de indocianina (Indocyanine Green, ICG). Este reagente é usado em medicina, como uma substância indicadora (por exemplo, para diagnóstico fotométrico de função hepática e angiografia de fluorescência) em células cardíacas, circulatórias, hepáticas e condições

oftálmicas. Podemos observar na Figura 15 que todas as células são capazes de metabolizar o corante, independente do substrato no qual foram cultivadas. O ICG é um ânion orgânico que é absorvido e eliminado exclusivamente pelo sistema de transporte hepático.

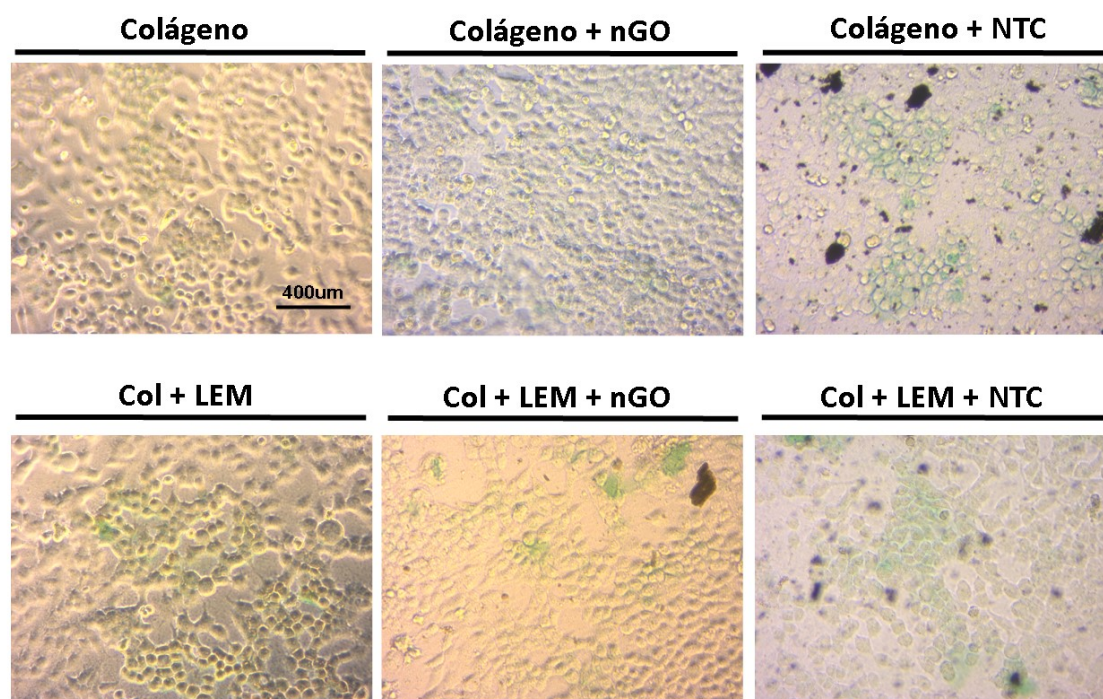


Figura 15. Atividade da linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2). Imagens da metabolização de verde de indocianina pelas HepG2. Aumento de 10x.

Cultura primária de hepatócitos

Para testar a viabilidade dos *scaffolds* (colágeno e colágeno+LEM) funcionalizados com nanomateriais como substrato de revestimento para culturas primárias, hepatócitos primários de camundongos C57/bl6 (8 semanas) foram cultivados sobre os *scaffolds* funcionalizados. Os *scaffolds* de colágeno puro foram utilizados como controles, visto que os hepatócitos primários possuem baixa aderência em substratos não revestidos. A viabilidade dos hepatócitos cultivados em *scaffolds* de LEM (col+LEM, col+LEM+nGO e col+LEM+NTC) foi significativamente superior comparado ao *scaffolds* de colágeno (col, col+nGO e col+NTC) (Figura 16A). Entretanto, a adição de nanomateriais ao *scaffold* de colágeno+LEM não foi benéfica para a viabilidade dos hepatócitos (Figura 16B) quando comparados aos *scaffolds* de col+LEM. Os hepatócitos plaqueados em *scaffolds* de colágeno apresentam morfologia mais achatada, apresentam-se espalhados na matriz, demonstrando forte adesão ao substrato (Figura 16B) enquanto os hepatócitos plaqueados em *scaffolds* de LEM apresentam morfologia semelhante a esferóides (Figura 16B).

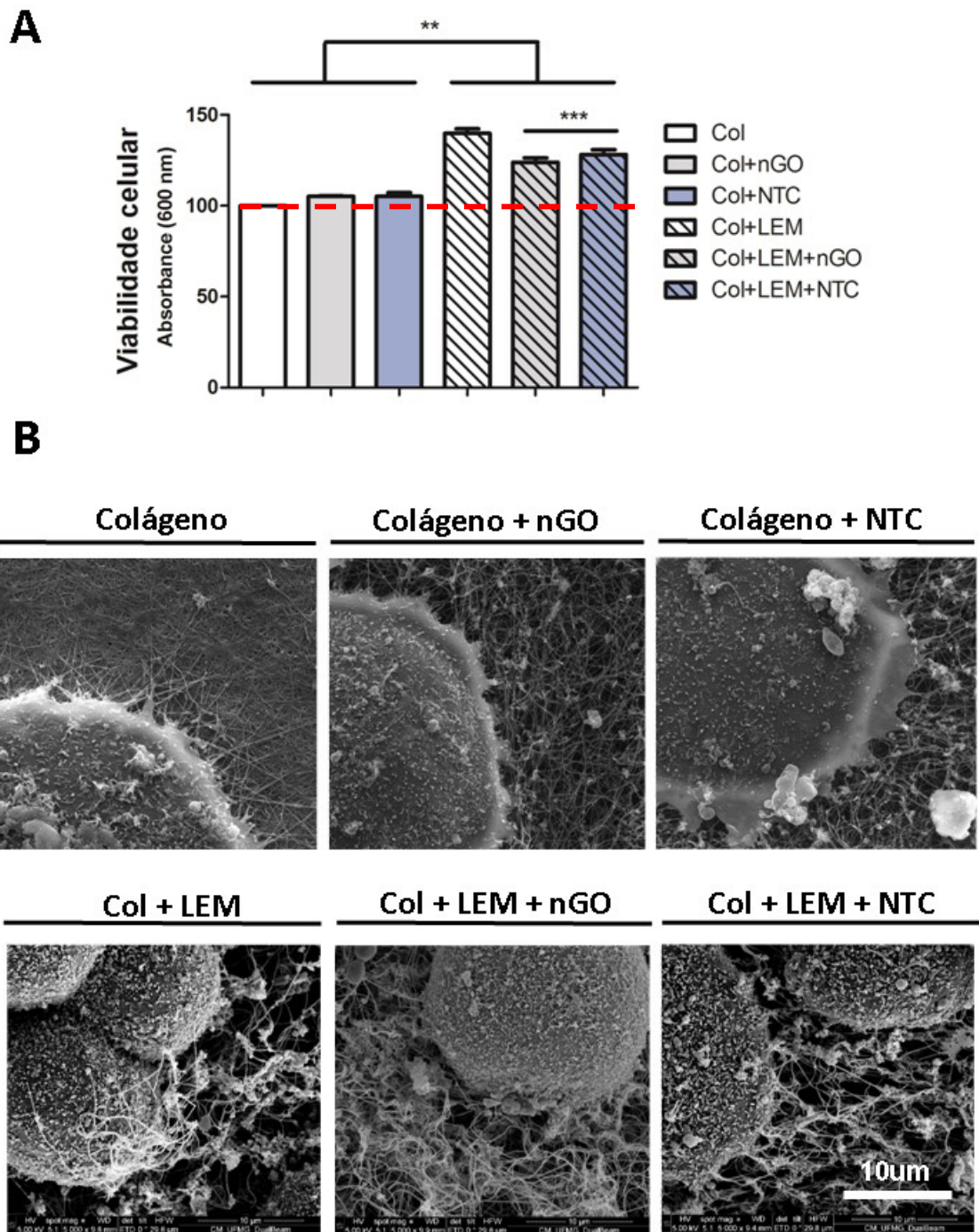


Figura 16. Cultura primária de hepatócitos. A. Viabilidade de hepatócitos cultivados nos *scaffolds* após 24 horas. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test, (n=6; *p<0,05). B. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de hepatócitos cultivados nos *scaffolds* após 24 horas.

Apesar de comprovarmos a eficiência da descellularização, remanescentes celulares presentes nas matrizes podem gerar uma resposta inflamatória indesejada em experimentos *in vivo*. Sendo assim, 100 μ L de colágeno e colágeno enriquecido com LEM foram injetados via subcutânea nos camundongos C57/bl6 (machos, 12 semanas, n=6) para avaliar a taxa de

absorção e a resposta imunológica da matriz *in vivo*, após 7 dias da realização do implante. Após 7 dias da realização do implante, foi possível observar que os animais os quais foram aplicados o colágeno puro absorveram menos o implante do que os animais que receberam colágeno funcionalizado com LEM (Figura 17A). O peso dos implantes confirmou os achados anteriores demonstrando uma diferença significativa entre os pesos dos implantes de colágeno puro e dos implantes de col+LEM (Figura 17B).

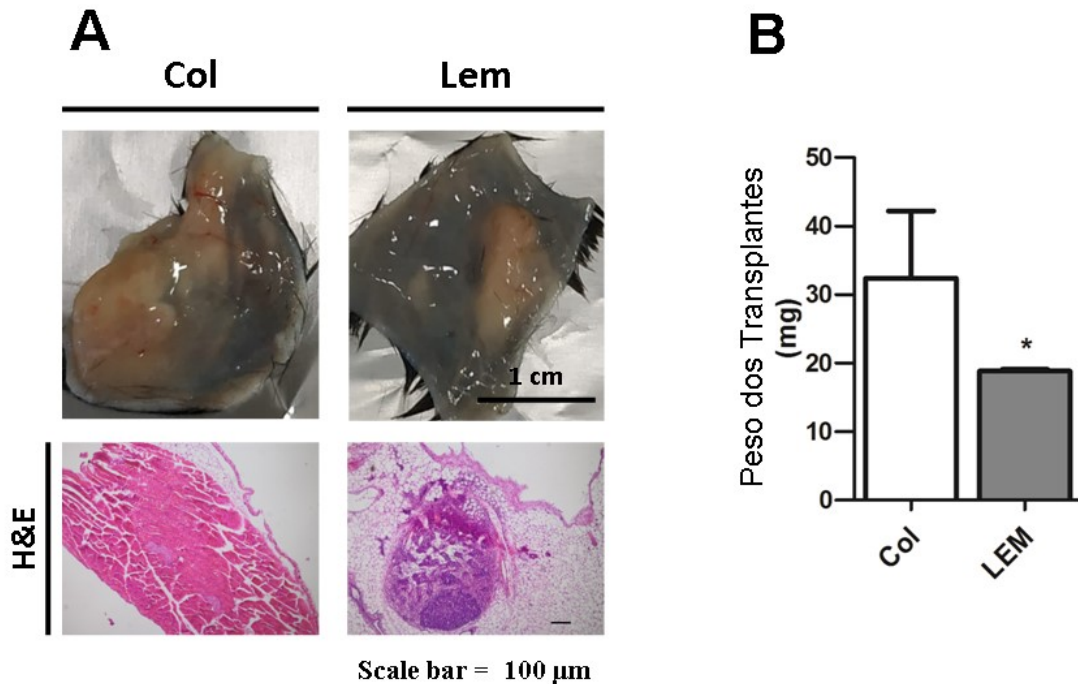


Figura 17. Taxa de absorção de Colágeno e LEM *in vivo*. A. Absorção do Colágeno e LEM *in vivo* após 7 dias. B. Peso dos implantes. Foi aplicado o test *t* de Student (n=6; *p<0,05).

A fim de investigar o potencial osteogênico dos *scaffolds* na mudança e/ou na manutenção do *cell fate* de pré-osteoblastos, novos ensaios foram realizados com células de osteoblastos de Wistar (rOB), cultivados em meio basal (meio de cultura DMEM + 10% SFB).

Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar cultivados com meio basal

Quando cultivados por sete dias nos *scaffolds*, os rOB apresentaram viabilidade significativamente menor nos *scaffolds* de colágeno+nGO (Figura 18A). Em contrapartida, após 14 dias, a viabilidade dos rOB nesses *scaffolds* é recuperada e os rOB cultivados nos *scaffolds* colágeno+NTC, colágeno+LEM+nGO e colágeno+LEM+NTC demonstram menor viabilidade celular quando comparados aos osteoblastos cultivados nos *scaffolds* de colágeno puro (Figura 18B).

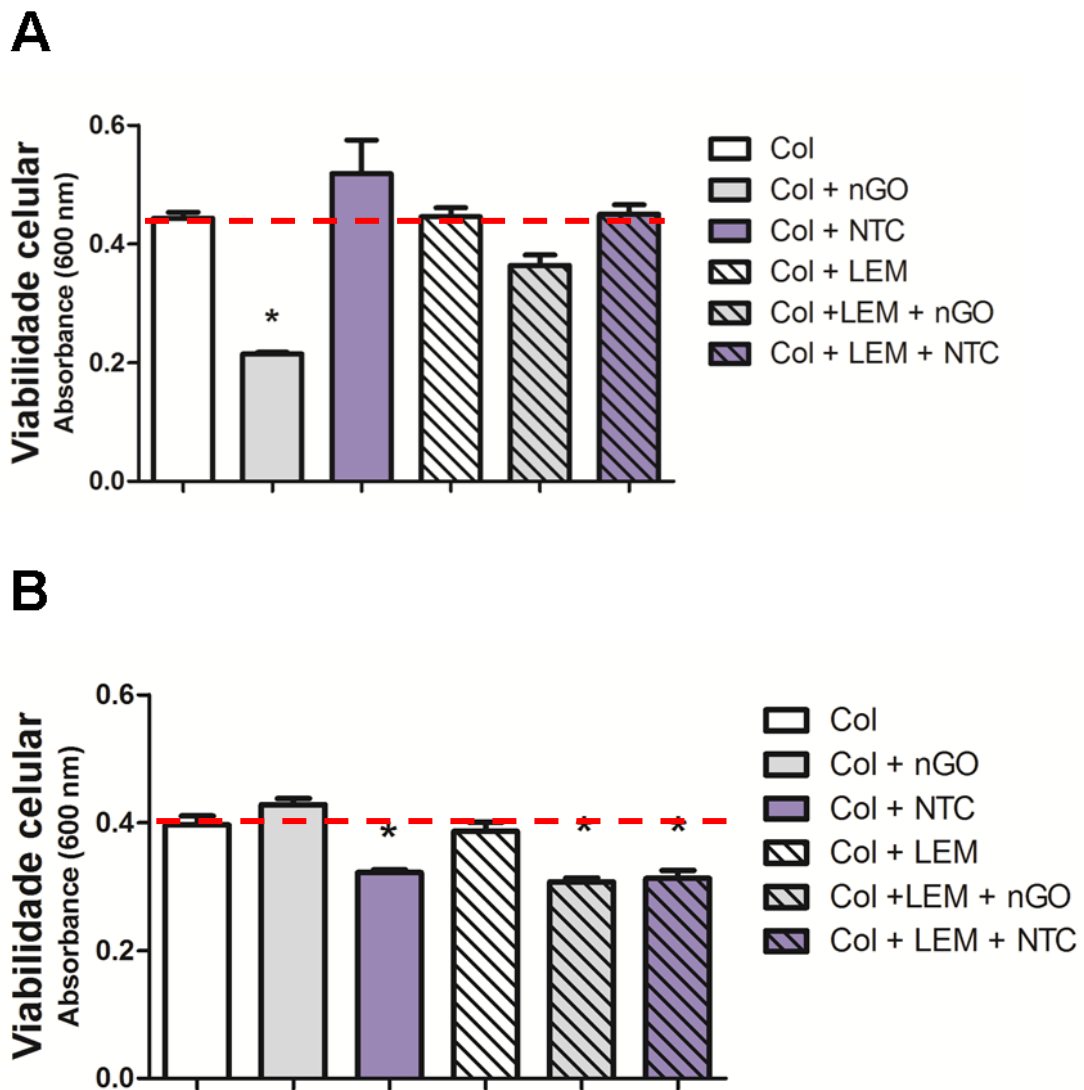


Figura 18. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar cultivados com meio basal. Viabilidade de rOB cultivados nos *scaffolds* com meio DMEM, após **A.** 7 e **B.** 14 dias. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test ($n=6$; $*p<0,05$). a: significativamente maior que Col. *: significativamente menor que Col.

A fim de avaliar o potencial osteogênico dos *scaffolds* (colágeno e colágeno+LEM) funcionalizados com nanomateriais na manutenção do *cell fate* de culturas primárias de pré-osteoblastos, rOBs foram cultivados sobre os *scaffolds* funcionalizados. Os *scaffolds* de colágeno puro foram utilizados como controles. A atividade da fosfatase alcalina dos osteoblastos cultivados em *scaffolds* de Col+LEM+nGO foi significativamente inferior comparado ao *scaffolds* de colágeno puro em 7 (Figura 19A) e 14 (Figura 19B) dias de cultivo.

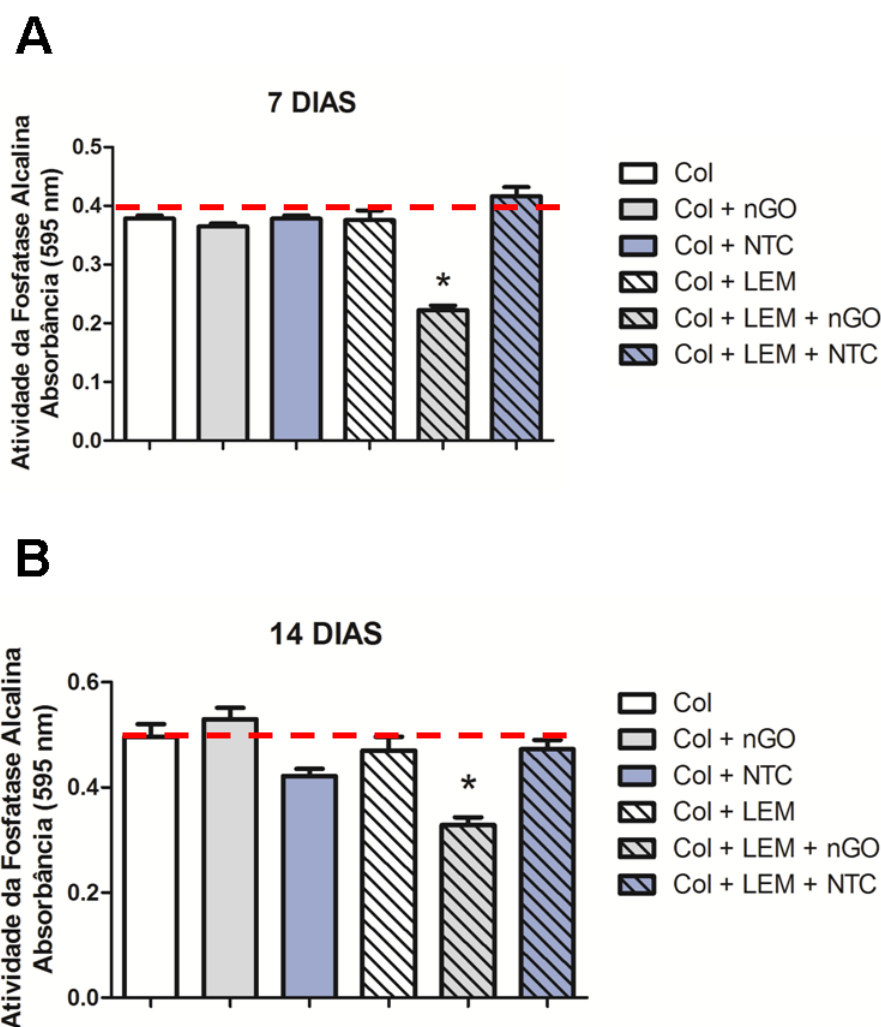


Figura 19. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar cultivados com meio basal. Atividade da fosfatase alcalina em rOB cultivados nos *scaffolds* com meio DMEM, após **A.** 7 e **B.** 14 dias. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test (n=6; *p<0,05). *: significativamente menor que Col.

A síntese de colágeno pelos osteoblastos cultivados em *scaffolds* de Col+nGO foi significativamente superior comparado aos osteoblastos cultivados em *scaffolds* de colágeno puro aos 7 dias de cultivo (Figura 20A). Em contrapartida, a síntese de colágeno pelos osteoblastos cultivados em *scaffolds* de Col+LEM+nGO foi significativamente inferior comparado aos osteoblastos cultivados em *scaffolds* de colágeno puro aos 7 dias de cultivo (Figura 20A). Após 14 dias de cultivo, não foi observado diferenças significativas na síntese de colágeno pelos osteoblastos cultivados nos diferentes *scaffolds* (Figura 20B).

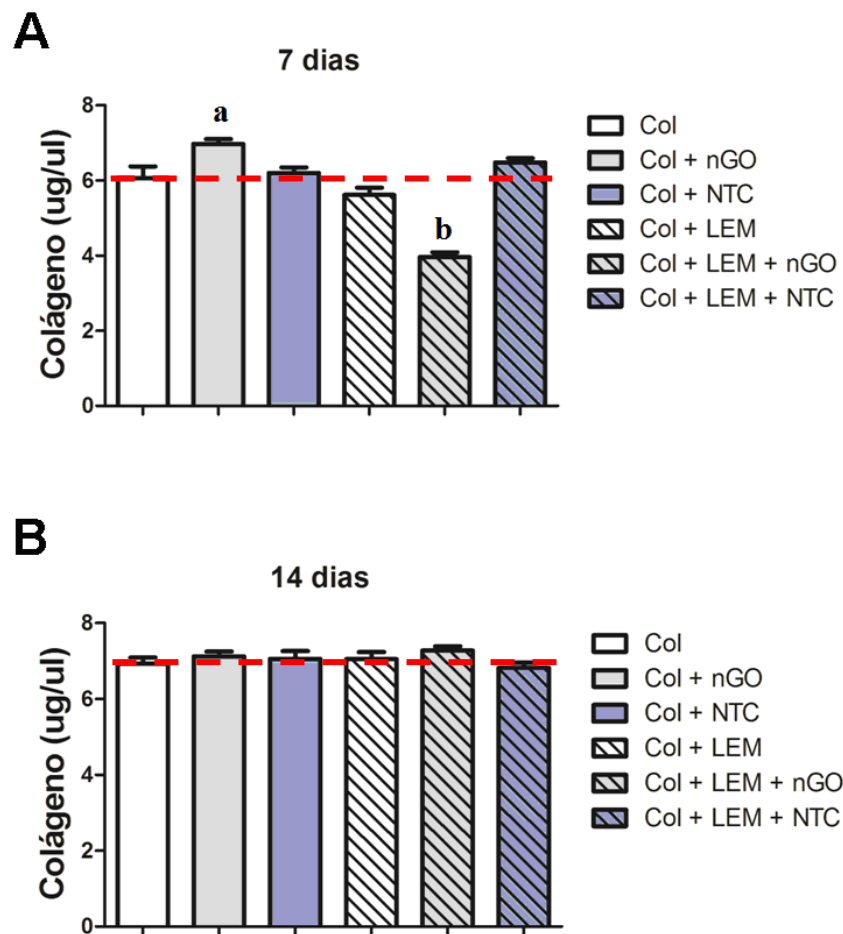


Figura 20. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar cultivados com meio basal. Síntese de colágeno em rOB cultivados nos *scaffolds* com meio DMEM, após **A.** 7 e **B.** 14 dias. Foi aplicado one-way ANOVA com Dunnett's Multiple Comparison Test (n=6; p<0,05). A: significativamente maior que Col. b: significativamente menor que Col.

Em seguida, a imagem da atividade da fosfatase alcalina produzidas pelas células após 7 dias de cultivo foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 21). Foi observado que os *scaffolds* de colágeno, colágeno+nGO, colágeno+LEM e colágeno+LEM+NTC apresentam elevada atividade da fosfatase alcalina (em roxo). Os *scaffolds* se descolaram do fundo do poço, iniciando a formação de esferóides. Os *scaffolds* de colágeno+NTC e colágeno+LEM+nGO também apresentam elevada atividade da fosfatase alcalina (em roxo) entretanto, os *scaffolds* permaneceram aderidos ao fundo da placa (Figura 21).

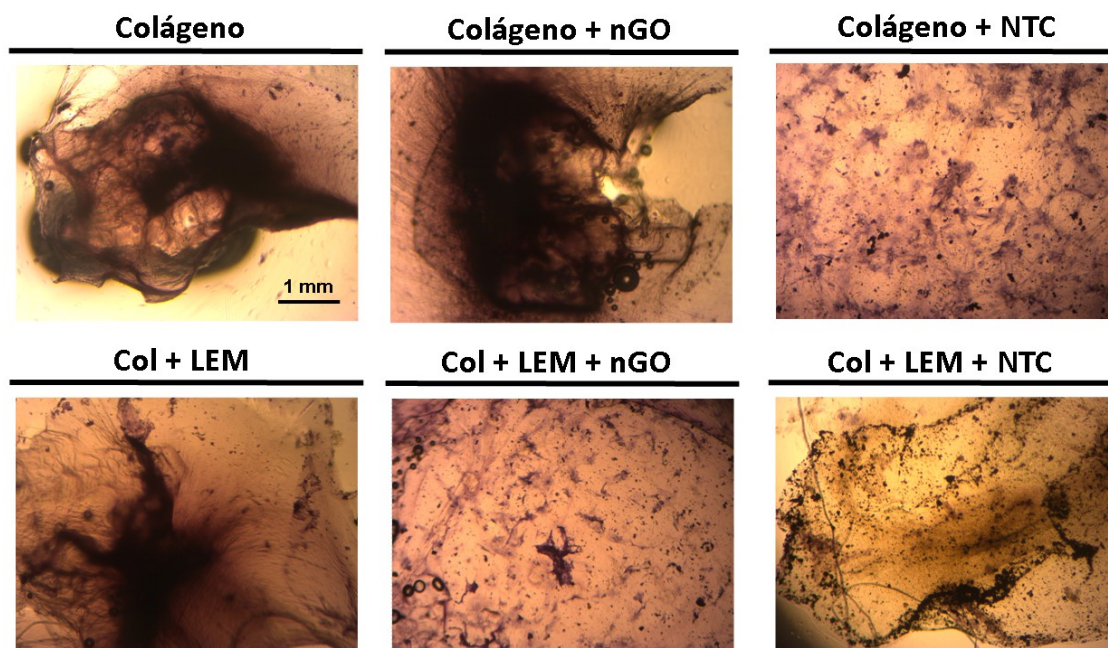


Figura 21. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar. Imagens da atividade da fosfatase alcalina após 7 dias de cultivo com meio basal. Aumento de 40x.

Após 14 dias de cultivo, a imagem da atividade da fosfatase alcalina produzidas pelas células foram novamente capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 22). Foi observado o descolamento de todos os *scaffolds*. Todos os *scaffolds* apresentaram elevada atividade da fosfatase alcalina (em roxo) (Figura 22).

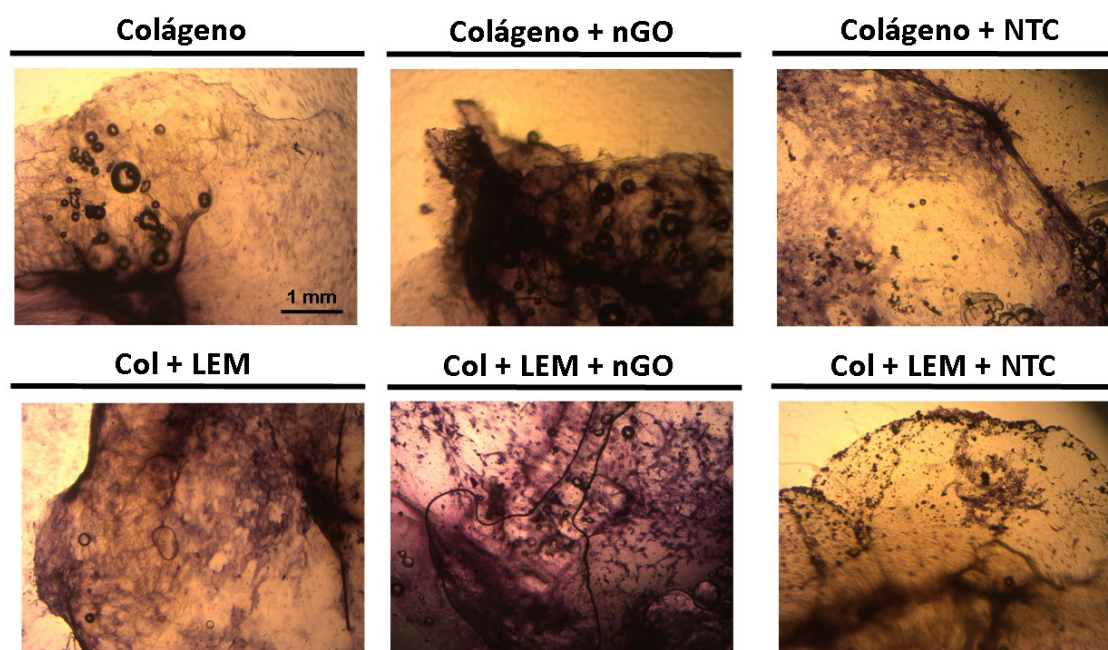


Figura 22. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar. Imagens da atividade da fosfatase alcalina após 14 dias de cultivo com meio basal. Aumento de 40x.

Os *scaffolds* foram corados com vermelho de alizarina após 7 (Figura 23) e 14 (Figura 24) de cultivo e as imagens foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German). Em 7 dias, foi observado a presença de depósitos de cálcio, corados positivamente pelo vermelho de alizarina na região central dos *scaffolds* de colágeno, colágeno+nGO e colágeno+LEM. Os *scaffolds* de colágeno+NTC e colágeno+LEM+nGO apresentaram regiões dispersas (pontos vermelhos) espalhados pelos *scaffolds*. Não foi possível evidenciar a coloração nos *scaffolds* de colágeno+LEM+NTC (Figura 23).

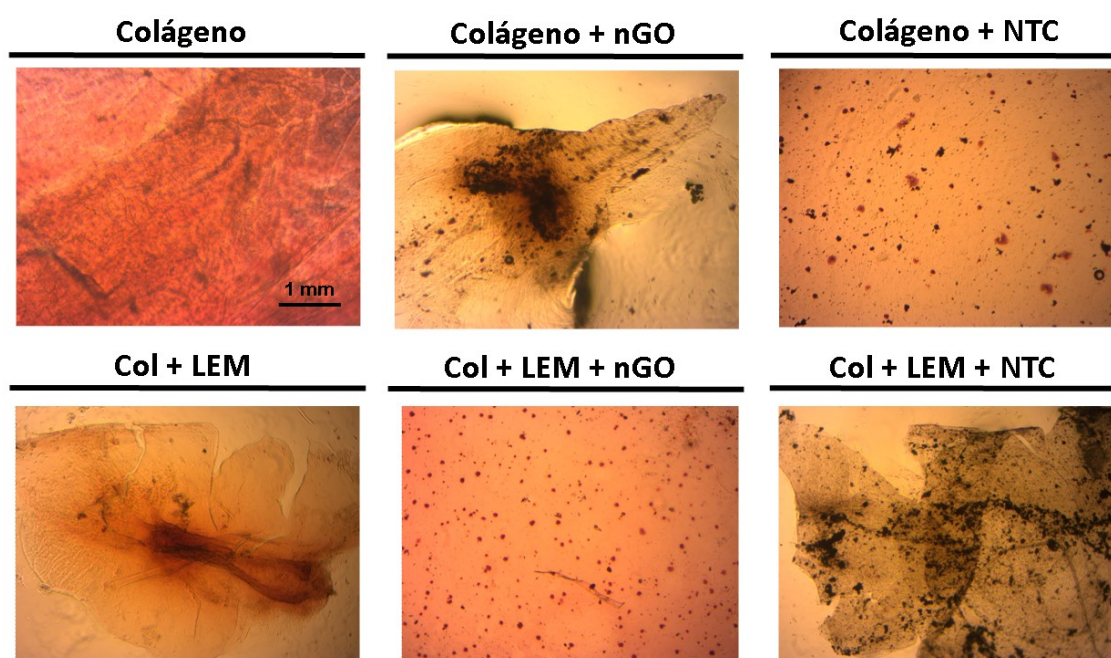


Figura 23. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar. Imagens da coloração com vermelho de Alizarina após 7 dias de cultivo com meio basal. Aumento de 40x.

Em 14 dias, foi observada a presença de depósitos de cálcio, corados positivamente pelo vermelho de alizarina na região central dos *scaffolds* de colágeno e colágeno+LEM. Os *scaffolds* de colágeno+nGO e colágeno+LEM+nGO apresentavam coloração positiva em regiões específicas dos *scaffolds* (regiões com acúmulo de crescimento celular). Não foi possível evidenciar a coloração nos *scaffolds* de colágeno+NTC e colágeno+LEM+NTC (Figura 24).

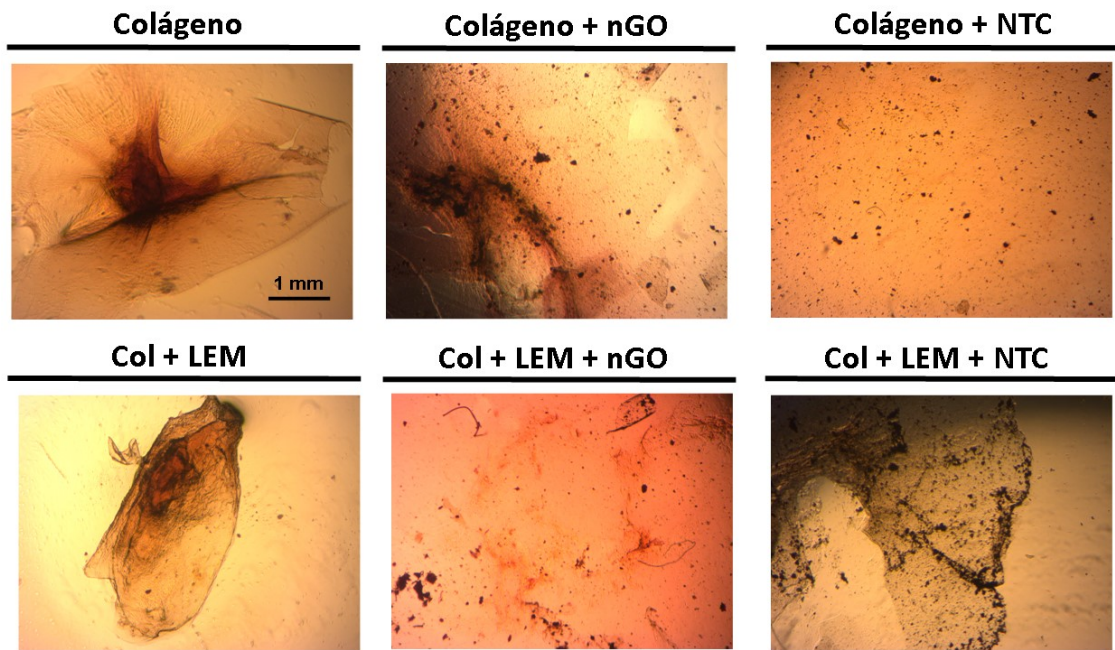


Figura 24. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar. Imagens da coloração com vermelho de Alizarina 14 dias de cultivo com meio basal. Aumento de 40x.

Os *scaffolds* foram corados pela coloração *Von Kossa* após 7 e 14 dias de cultivo e as imagens foram capturadas pelo microscópio invertido (Primovert, Zeiss, German) (Figura 25). Todos os *scaffolds* coraram positivamente para *Von Kossa*. Em 7 e 14 dias, os *scaffolds* de colágeno, colágeno+nGO, colágeno+LEM e colágeno+LEM+NTC se descolaram do fundo do poço, formando esferóides. Os *scaffolds* de colágeno+NTC e colágeno+LEM+nGO se encontravam presos ao fundo do poço e corados fortemente em 7 dias de cultura. Em 14 dias de cultura, os *scaffolds* de colágeno+NTC apresentam pontos específicos de coloração pelo *Von Kossa* enquanto o *scaffolds* de colágeno+LEM+nGO se coraram fortemente pelo *Von Kossa* (Figura 25).

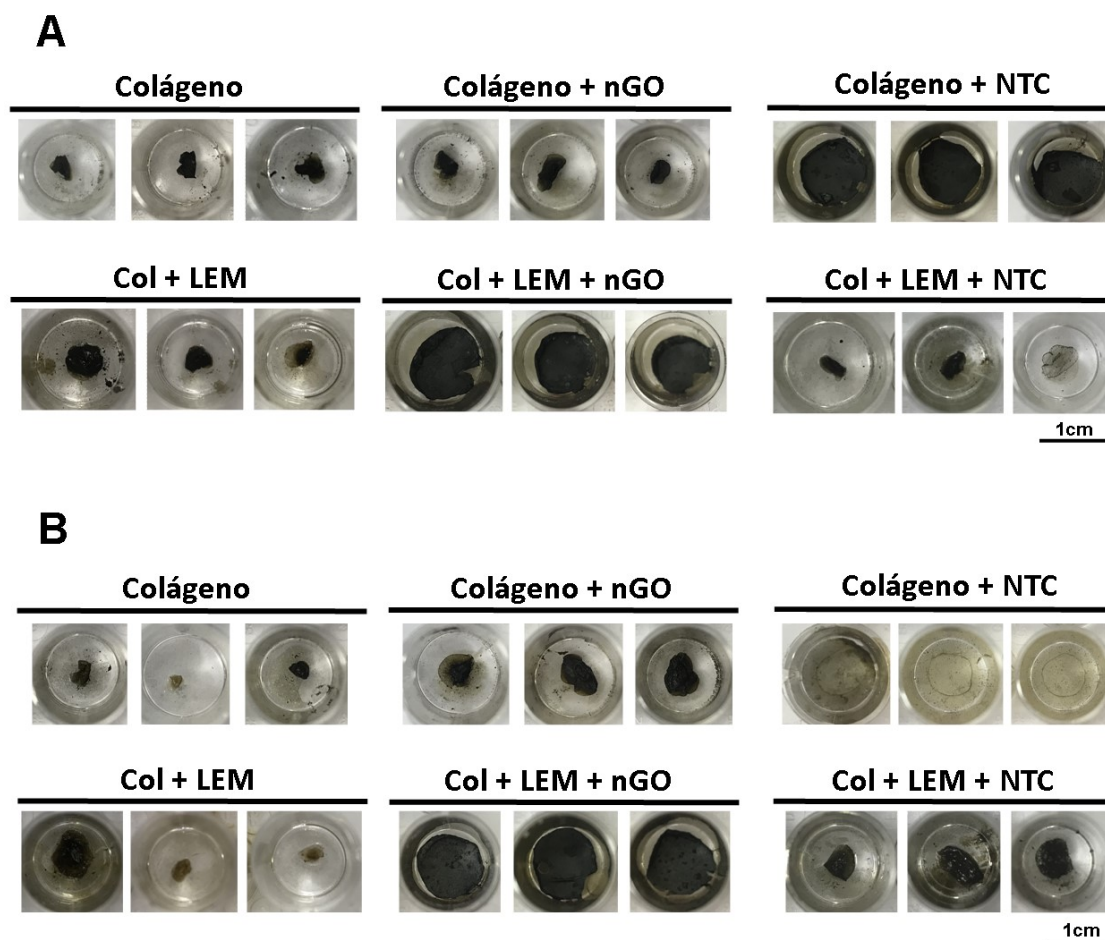


Figura 25. Cultura de osteoblastos de calvária de neonatos Wistar. Imagens da coloração *Von Kossa* após **A.** 7 dias de cultivo. **B.** 14 dias de cultivo. As imagens representam os poços de uma placa de 48 wells. Cada well apresenta 1cm de diâmetro.

5. Discussão

Neste estudo, avaliamos a eficiência de nanomateriais em *scaffolds* de colágeno e a melhora desses *scaffolds* pela adição de MEC de fígado descelularizados para culturas primárias de hepatócitos e implantes. O fígado é o principal órgão responsável pela homeostase corporal, responsável por funções vitais como a síntese de proteínas plasmáticas (57), homeostase metabólica, desintoxicação de amônia (58) e metabolismo de diversos compostos. O cultivo de hepatócitos primários é muito utilizado no estudo de hepatotoxicidade e metabolismo de drogas, mas recentemente também estão sendo utilizados na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas doenças hepáticas (14). Neste estudo, foi realizada a caracterização de *scaffolds* de colágenos e *scaffolds* de LEM funcionalizados com dois nanomateriais alótropos do carbono em células de hepatocarcinoma humano (HepG2), culturas primárias de hepatócitos de camundongos e osteoblastos de ratos Wistar. Nosso objetivo foi produzir *scaffolds* funcionalizados com nanomateriais viáveis para

culturas celulares primárias de difícil manutenção como o hepatócito e verificar a contribuição da MEC e dos nanomateriais no *cell fate* das células maduras, visando o melhoramento da cultura e o estudo de propriedades fundamentais dos hepatócitos semelhantes ao ambiente *in natura*.

Antes de iniciar quaisquer ensaios biológicos, os nanomateriais foram caracterizados, para elucidar a sua morfologia e integridade estrutural. Foram realizadas imagens de MET que indicaram que os nGO apresentavam-se como nanofolhas de GO altamente aglomeradas na forma de flocos, a morfologia típica deste nanomaterial (48) (Figura 3A). Os NTC apresentam-se no plano sagital e é composto por várias linhas de carbono dispostas concentricamente em torno de uma região central que forma a luz do tubo (Figura 3B). Esse nanomaterial já foi extensivamente caracterizado na literatura e é morfologicamente e estruturalmente compatível com os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWNTC) (49). Consequente, foram realizadas as medidas do potencial zeta desses nanomateriais, dispersos em água e em meio basal (meio DMEM suplementado com 10% de SFB). Como o potencial zeta depende do pH da amostra, todas as amostras foram testadas em pH fisiológico (7,2). Em uma solução iônica, as nanopartículas apresentam duas camadas de íons denominadas de camada dupla elétrica. Essa camada dupla elétrica é composta por uma camada de íons fortemente ligados à superfície do nanomaterial na chamada camada Stern. Externamente a esta camada há uma camada de íons fracamente associados. A movimentação da partícula cria uma distinção entre essas duas camadas de íons e o potencial elétrico gerado neste movimento é denominado potencial zeta e está relacionada à carga da superfície da partícula (59). Em água, os nGO e os NTC apresentam potencial zeta de -18,6 mV e -30,4 mV, respectivamente. Em meio basal, os nGO e os NTCs apresentam potencial zeta de -472 mV e -503 mV, respectivamente (Figura 3C). Segundo Clogston et. al (59), partículas com potencial zeta na magnitude de -10 e +10 mV são consideradas partículas neutras, enquanto nanopartículas com potenciais zeta maiores que +30 mV ou menores que -30 mV são consideradas fortemente catiônicos e aniônicos, respectivamente (59). Piaskowski et. al mensuraram o potencial zeta de GO que mediram -38 mV para nanopartículas dispersas em meio aquoso. Segundo os autores, este valor confirmou a existência de uma suspensão de óxido de grafeno estável devido à presença de uma série de ligantes, como grupos carboxílicos ionizados na superfície do GO (60). Em acordo com nossos dados, Shannahan et. al (61) mensuraram o potencial zeta de diferentes alótropos de NTC e verificaram um potencial de aproximadamente -40mV quando dispersos em água (61). Quando mensuradas

em meio de dispersão DMEM suplementado com SFB, as amostras apresentaram potenciais zeta ainda mais negativos em comparação com as amostras dispersas em água provavelmente devido à presença de íons e biomoléculas presentes no meio de cultura DMEM (61) (Figura 3C).

As nanopartículas foram caracterizadas pela espectroscopia RAMAN e a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Figura 4 e 5). Podemos observar a presença da banda G e da banda D característico destes nanomateriais. A banda G é comum em todas as formas de carbono sp^2 e, por isso, podemos encontrá-la em ambos nanomateriais. A banda D é encontrada devido a modificação dos carbonos sp^2 nas amostras de nGO e, nos NTC, devido à carboxilação que ocorre durante a sua síntese (48, 50-52). Mais tarde, essas modificações nas nanopartículas foram observadas no FTIR.

Para produzir os *scaffolds* funcionalizados com a matriz extracelular de fígados (LEM), os fígados de camundongos C57/bl6 (4 semanas) tiveram seus conteúdos celulares removidos. Assim que os fígados se encontraram translúcidos, a remoção dos componentes celulares foi confirmada pela coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e azul de toluidina (Figura 6A) e pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 6C). As colorações histológicas confirmaram a remoção dos envoltórios nucleares e para confirmar a ausência de DNA nas amostras, o conteúdo de DNA foi quantificado. O conteúdo de DNA na LEM foi quantificado em 1,43% em comparação com o fígado nativo (100%) (Figura 6B). Estes resultados confirmaram a ausência de DNA nas amostras descélularizadas, demonstrando que além da remoção do envoltório nuclear, não há permanência de DNA na amostra. O conteúdo de DNA encontrado nas nossas amostras é aceitável e corroboram com os dados da literatura, que geralmente relatam um conteúdo de DNA inferior a 4% em tecidos descélularizados (62, 63). A (matriz extracelular) ECM é formada por um complexo protéico diversificado que inclui proteoglicanos, colágeno, fibronectina e laminina (29, 64). Por isso, nós avalizamos, através de coloração por imunofluorescência, a preservação de estas proteínas e, através da coloração por alcian blue, a preservação dos GAGs após o processo de descélularização. Foi observado uma grande preservação de colágeno tipo I, laminina e fibronectina nas matrizes descélularizadas (Figura 6C). O contraste negativo para o DAPI nas matrizes demonstrou ausência de células na LEM. Nós observamos determinada preservação do conteúdo de GAGs (3,12ug/ml) após a descélularização (Figura 6D), além da coloração positiva para o alcian blue (Figura 6E). Nossos dados corroboram com os achados anteriores, que mostraram a preservação do colágeno, laminina e fibronectina, componentes da membrana basal,

glicosaminoglicanos e a árvore vascular em matrizes descelularizadas de fígados (63). Khan e colaboradores (65) demonstraram a relevância do padrão de sulfatação dos glicosaminoglicanos (GAGs) em culturas celulares, sendo de grande importância na modulação da diferenciação celular das células-tronco. Os GAGs possuem vários fatores de crescimento ligados fortemente a eles, e desta forma, as LEM apresentam concentrações acima dos valores fisiológicos conferindo a LEM indícios que auxiliam na manutenção do fenótipo e função celular (27-29, 66).

Em seguida, nós avaliamos o colágeno extraído das caudas dos ratos (Figura 7A) em comparação com três diferentes colágenos: comercial (Sigma), camundongo e bovino, muito utilizados em cultura celular. Os colágenos testados apresentaram bandas semelhantes, mas espessuras diferentes (Figura 7D). Observou-se que os colágenos apresentam um padrão de bandejamento entre 130 e 100kDa. O protocógeno é formado por uma molécula tripla helicoidal composta por duas cadeiras $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ e duas das três cadeias são reticuladas (67). O colágeno puro (sem sofrer digestão enzimática) é separado em SDS-PAGE, de acordo com o peso molecular, em quatro bandas distintas: dímeros reticulados $\alpha 1$ - $\alpha 1$ e $\alpha 1$ - $\alpha 2$, com peso molecular de aproximadamente 250kDa e monômero $\alpha 1$ e $\alpha 2$, com peso molecular entre 130 e 100kDa (67-69).

Iniciando os ensaios biológicos, primeiramente nós avaliamos a citotoxicidade dos nanomateriais em cultura primária de células-tronco mesenquimais (hASC) (Figura 8A), células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (Figura 8B) e osteoblastos de calvária de ratos Wistar (rOB) (Figura 8C). Os nanomateriais são pequenas partículas com alto grau de carga superficial que pode variar entre 1 a 100 nm (39). Esta alta reatividade superficial facilita a permeabilidade celular dos nanomateriais e seu influxo é capaz de interferir em atividades biológicas a nível celular. Contudo, a disponibilidade das nanopartículas deve ser controlada de visto que o excesso de nanopartículas disponibilizadas para o corpo por várias rotas pode induzir citotoxicidade biológica (40) e até mesmo apoptose (39). Neste trabalho, nós conseguimos obter níveis seguros do uso de dois alótropos do carbono, nGO e NTC. Foram consideradas concentrações citotóxicas aquelas as quais há menor viabilidade celular das células em comparação a viabilidade das células que não foram expostas aos nanomateriais (controles). Os testes de viabilidade com os nanomateriais são de extrema importância, pois são eles que definem a aplicabilidade deste nanomaterial *in vitro* e *in vivo*. Nanomateriais com baixa citotoxicidade são ideal para entrega de genes e drogas com liberação controlada enquanto nanomateriais com alta toxicidade devem possuir uma alta especificidade em

relação ao alvo, que geralmente trata-se do controle de células indesejáveis (70, 71). A partir dos ensaios anteriores, nós funcionalizamos o colágeno com: 15ug/mL de nGO, 30ug/mL de NTC, 1mg/mL de LEM + 15ug/mL de nGO e 1mg/mL de LEM + 30ug/mL de NTC.

Após a funcionalização e preparação dos *scaffolds*, foi realizada a caracterização desse novo biomaterial. Nossos dados de RAMAN e FTIR mostraram modificações consistentes com a funcionalização dos nanomateriais demonstrando que os *scaffolds* foram funcionalizados aos nanomateriais com sucesso. A estrutura interna dos *scaffolds* foi analisada por MEV. O *scaffold* de colágeno puro se apresenta compactado com fibras grossas (Figura 11A e 11B). Com a adição dos nanomateriais, os *scaffolds* de colágeno apresentam uma estrutura menos compactada e fibras mais finas comparados com os *scaffolds* de colágeno puro (Figura 11A e 11B). Todos os *scaffolds* de LEM apresentaram uma estrutura menos compactada e fibras mais finas comparados com o *scaffolds* de colágeno puro, assemelhando-se aos *scaffolds* de colágeno com nanomateriais funcionalizados (Figura 11A e 11B).

As imagens de AFM nos mostram as fibrilas de colágeno semelhantes a tubos com distribuição não homogênea, como uma rede altamente reticulada e desordenada. Essa desordem permite a reorientação do colágeno dentro de uma fibrila (67) (Figura 12). Sridharan e colaboradores (72) demonstraram por imagens de AFM a modificação estrutural do colágeno após a adição de SWNTC, levando a fibrilas com maiores convexidades. Segundo os autores, a adição do SWNTC também confere rigidez adicional às fibrilas de colágeno (72) (Figura 12). Dito isso, seria importante testar a capacidade mecânica dos nossos novos biocompósitos para averiguar as possíveis mudanças na rigidez das matrizes. Em conjunto, esses dados confirmam o sucesso da funcionalização dos nanomateriais ao colágeno e ao colágeno+LEM.

Após a caracterização dos *scaffolds* funcionalizados, nós testamos a viabilidade desses novos biomateriais na viabilidade de hASC (Figura 13A) e HepG2 (Figura 13B) após 12, 24 e 48 horas. Foi observado menor viabilidade celular apenas nas hASC (Figura 13A) e HepG2 (Figura 13B) cultivadas nos *scaffolds* de colágeno+LEM+nGO quando comparadas aos *scaffolds* de colágeno puro. Possivelmente isso se deve ao fato dos *scaffold* de colágeno+LEM+nGO se apresentarem menos estáveis e com maior grau de fluidez. É possível que a baixa citotoxicidade encontrada nos demais *scaffolds* funcionalizados com nGO e NTC seja devido à adsorção dos nanomateriais à superfície do colágeno induzindo a

formação de uma proteína corona nanoestruturada (70), mas, ainda são necessários mais estudos físicos e bioquímicos dos *scaffolds* funcionalizados.

As exposições aguda e crônica dos materiais biológicos aos nanomateriais geram diferentes respostas biológicas (73). Há autores que afirmam que ensaios com NTC só fornecem informações valiosas quando aplicados ensaios com exposição crônica visto que o organismo pode se adaptar as condições na qual esta sendo exposto (73). Exposições de 12, 24 e 48 horas podem ser consideradas exposições agudas e não levar em conta a capacidade adaptativa das células ao microambiente dos *scaffolds*. Pensando-se nisso, nós avaliamos o comportamento das HepG2 após 7 dias de cultivo (Figura 12). Após 7 dias de cultivo não foram observadas diferenças significativas na viabilidade (Figura 14A) e na secreção de albumina (Figura 14B) pelas HepG2 cultivadas nos diferentes *scaffolds* comparadas as HepG2 cultivadas nos *scaffolds* de colágeno puro. Além disso, as células HepG2 foram capazes de metabolizar o corante verde de indocianina apresentando-se metabolicamente ativas (Figura 15). Entretanto, a síntese de uréia é significativamente menor nos *scaffolds* de colágeno+nGO e colágeno+NTC. Nossos dados sugerem que após 7 dias de cultura, as HepG2 conseguem se adaptar à citotoxicidade causada em exposições agudas aos *scaffolds* de colágeno+LEM+nGO observado pela recuperação da viabilidade nesta células. Contudo, exposições crônicas aos *scaffolds* de colágeno+nGO e colágeno+NTC afetam a síntese de uréia comprometendo em parte a funcionalidade dessas células. O mesmo não ocorreu com os *scaffolds* colágeno+LEM+nGO e colágeno+LEM+NTC provavelmente devido à adição da LEM na matriz.

Nos ensaios com hepatócitos primários nossos dados demonstraram alta viabilidade dos hepatócitos cultivados em col+LEM (Figura 16A). A LEM apresenta características que as tornam melhores que as matrizes comerciais e que o colágeno tipo 1. A matriz extracelular é dinâmica, sendo capaz de interagir com as células residentes nela, podendo sofrer modificações organizacional e estrutural de acordo com as necessidades metabólicas do tecido residentes (29). Zhang et. al. demonstraram que a ECM mimetiza melhor o ambiente *in vivo*, e com isso, as células cultivadas em ECM derivadas do seu tecido de origem possuem maior taxa de proliferação ao longo do cultivo celular (28). Além disso, a ECM ajuda na manutenção do fenótipo e função da cultura celular (28). Observamos que os hepatócitos cultivados em matrizes enriquecidas com LEM (col+LEM, col+LEM+nGO e col+LEM+NTC) apresentavam a morfologia de esferóides (Figura 16B), se assemelhando aos hepatócitos encontrados *in vivo* ou em culturas sanduíches (74) enquanto os hepatócitos

cultivados nas matrizes de colágeno (col, col+ nGO e col+ NTC) encontravam-se completamente espalhados (Figura 16B).

A taxa de absorção dos *scaffolds* de colágeno e LEM foi avaliada por cortes histológicos. Os *scaffolds* de colágeno (2mg/ml) e *scaffolds* de LEM em uma proporção de colágeno+LEM (2mg/1mg) foram injetados subcutaneamente, um em cada lado, em camundongos C57/bl6. Os *scaffolds* de LEM sofreram retração significativa no volume comparado com os *scaffolds* de colágeno, 7 dias após o implante subcutâneo (Figura 17A). Os dados observados foram confirmados após a análise dos pesos dos implantes, demonstrando determinada manutenção do volume dos *scaffolds* de colágeno (Figura 17B). Provavelmente, a taxa de absorção de LEM é maior que a taxa de absorção do colágeno, devido a origem das proteínas que compõem os *scaffolds*. É natural uma resposta inflamatória inicial diante de qualquer substância implantada no hospedeiro (75). Entretanto, a LEM é um material nativo e, pode não submeter-se a uma série de reações imunológicas do hospedeiro a corpos estranhos, como é o caso do colágeno, oriundo de outro organismo (76). Um dos efeitos da resposta inflamatória crônica é a formação de cápsula colágena fibrosa e densa ao redor do implante (77) e, há a possibilidade do implante de colágeno puro se encontrar em maior tamanho e peso após 7 dias devido a uma resposta inflamatória crônica. Contudo, ainda são necessários ensaios imunológicos para averiguar a resposta inflamatória dos animais perante os implantes.

Ainda é necessário mais estudos para elucidar possíveis benefícios bioquímicos e biofísicos na sobrevivência de hepatócitos em cultura. Estudar os mecanismos moleculares responsáveis pela polaridade dos hepatócitos é essencial para a compreensão da estrutura e função do tecido hepático. Elucidar a potencia e profundidade dos sinais bioquímicos e biomecânicos das ECM é de extrema importância para a produção de biomateriais de sucesso. Os biomateriais, além de substituir o tecido mazelado devem ser capazes de fornecer suportes físicos e bioquímicos de modo a mimetizar da melhor forma o tecido sadio.

O “*cells fate*” também pode ser determinado por características da ECM como elasticidade, geometria e adesão. As características estruturais e biofísicas da ECM são extremamente importantes para a diferenciação e organização das células (26). As ECMs são responsáveis por transduzir sinais biomecânicos via ECM-integrinas-citoesqueleto e, desta forma, determinar uma linhagem celular (78, 79). Contudo, nossos dados mostram que a ECM, associada ou não à nanomateriais, é insuficiente para modificar o fenótipo de células

maduras, como os pré-osteoblastos. Embora os osteoblastos cultivados nos *scaffolds* de col+LEM+nGO apresentassem menor atividade da fosfatase alcalina quando comparados aos *scaffolds* de colágeno puro, após 7 (Figura 19A e 21) e 14 (Figura 19B e 22) dias de cultura, os osteoblastos ainda apresentam a fosfatase alcalina ativa. Além disso, os osteoblastos são capazes de produzir colágeno igualmente independente do substrato que foram cultivados aos 14 dias de ensaio (Figura 20). Conquanto, todos os *scaffolds* coraram fracamente pelo vermelho de alizarina quando comparados aos *scaffolds* de colágeno puro tanto em 7 (Figura 23) dias quanto em 14 dias (Figura 24) de cultivo.

Nós observamos uma adaptação dos *scaffolds* de col, col+ nGO, col+LEM, e col+LEM+NTC no decorrer do experimento (7 e 14 dias), de modo que estes acompanhavam o crescimento dos osteoblastos, permitindo a formação de esferóides celulares (Figura 25). Em contrapartida, os *scaffolds* de col+ NTC e col+LEM+nGO permaneceram no mesmo formato de quando foram produzidos (Figura 25). In vivo, a ECM mantém uma “reciprocidade dinâmica” com as células nele residente, de modo que a ECM podem sofrer mudanças na sua composição estrutural e organizacional em decorrência das mudanças metabólicas do tecido (29). O interessante das microesferas de *scaffolds* maleáveis, como o produzido por nós, é que, diferentemente dos materiais biocompatíveis convencionais que servem como suporte para o crescimento celular, as células inseridas nas microesferas interagem tanto com outras células como com a matriz, podendo modificar sua estrutura (80).

Nossa estratégia é investigar mais profundamente a eficiência desses *scaffolds* na sobrevivência e na manutenção do *cell fate* de células maduras além de explorar a diferenciação e maturação de células-tronco mesenquimais em hepatócitos. Ademais, o sucesso na produção dos *scaffolds* funcionalizados com os nanomateriais abre possibilidades no estudo da entrega controlada de genes e drogas *in vitro e in vivo*.

6. Conclusão

Nosso trabalho demonstrou diferenças estruturais visíveis entre os *scaffolds* de colágeno e de LEM, além dos *scaffolds* de LEM apresentarem vestígios de MEC capaz de modificar a dinâmica celular em cultura. Nossos resultados demonstraram que os *scaffolds* de LEM são benéficos para a sobrevivência de hepatócitos em cultura, apesar de não demonstrarem diferenças significativas na função hepáticas de hepatócitos primários. Ademais, MEC, por si só, não é capaz de modificar o *cell fate* de células já pré-determinadas.

7. Perspectivas

- ❖ Avaliar a influência dos nanomateriais e LEM nos pontos de adesão celular. Além disso, é interessante avaliar se há mudanças na transcrição gênica e extrapolar uma alteração sinérgica entre a alteração morfologia das células, a mudança nos pontos de adesão e as possíveis alterações na transcrição gênica.
- ❖ Avaliar a transcrição gênica dos rOB cultivados com meio basal e com meio de indução hepatogênica. Além de realizar ensaios de imunofluorescência.
- ❖ Avaliar a influência hepatogênica dos *scaffolds* produzidos na diferenciação de hASC.
- ❖ Avaliar a influência osteogênica dos *scaffolds* produzidos na diferenciação de hASC.

8. Referências

1. Zhang Z, Liu J, Liu Y, Li Z, Gao WQ, He Z. Generation, characterization and potential therapeutic applications of mature and functional hepatocytes from stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2013;228(2):298-305.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Chen Y, Zhou H, Sarver AL, Zeng Y, Roy-Chowdhury J, Steer CJ, et al. Hepatic differentiation of liver-derived progenitor cells and their characterization by microRNA analysis. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(9):1086-97.
4. Lee JH, Park HJ, Jang IK, Kim HE, Lee DH, Park JK, et al. In vitro differentiation of human liver-derived stem cells with mesenchymal characteristics into immature hepatocyte-like cells. *Transplantation proceedings*. 2014;46(5):1633-7.
5. Jalani G, Jung CW, Lee JS, Lim DW. Fabrication and characterization of anisotropic nanofiber scaffolds for advanced drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*. 2014;9 Suppl 1:33-49.
6. Mendes RM, Silva GA, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life sciences*. 2010;87(7-8):215-22.
7. Sa MA, Andrade VB, Mendes RM, Caliari MV, Ladeira LO, Silva EE, et al. Carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate restore bone repair in diabetic rat sockets. *Oral diseases*. 2013;19(5):484-93.
8. Sa MA, Ribeiro HJ, Valverde TM, Sousa BR, Martins-Junior PA, Mendes RM, et al. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 2016;49(2):e4888.
9. Shao C, Liu Y, Chi J, Wang J, Zhao Z, Zhao Y. Responsive Inverse Opal Scaffolds with Biomimetic Enrichment Capability for Cell Culture. *Research*. 2019;2019:9783793.
10. Foundation NL. *Anatomy e Physiology: functions of the liver 2015* [cited 2016 28/01]. Available from: <http://nlfindia.com/liverzone/functions.asp#>.

11. Liu Y, Li H, Yan S, Wei J, Li X. Hepatocyte cocultures with endothelial cells and fibroblasts on micropatterned fibrous mats to promote liver-specific functions and capillary formation capabilities. *Biomacromolecules*. 2014;15(3):1044-54.
12. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition*. 1996;16:179-203.
13. Vasconcellos R, Alvarenga EC, Parreira RC, Lima SS, Resende RR. Exploring the cell signalling in hepatocyte differentiation. *Cellular signalling*. 2016;28(11):1773-88.
14. Schug M, Heise T, Bauer A, Storm D, Blaszkewicz M, Bedawy E, et al. Primary rat hepatocytes as in vitro system for gene expression studies: comparison of sandwich, Matrigel and 2D cultures. *Archives of toxicology*. 2008;82(12):923-31.
15. Sato T, Semura K, Fujimoto I. Microdimpled surface atelocollagen maintains primary human hepatocytes in culture and may promote their functionality compared with collagen coat culture. *International journal of molecular medicine*. 2019;44(3):960-72.
16. Enat R, Gilhar A. Vitiligo and primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology*. 1984;79(10):804-5.
17. Chowdhury SR, Mh Busra MF, Lokanathan Y, Ng MH, Law JX, Cletus UC, et al. Collagen Type I: A Versatile Biomaterial. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018;1077:389-414.
18. Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW, Liu J. Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *World journal of gastroenterology*. 2004;10(5):699-702.
19. Peterlik H, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. From brittle to ductile fracture of bone. *Nature materials*. 2006;5(1):52-5.
20. Jimenez-Palomar I, Shipov A, Shahar R, Barber AH. Structural orientation dependent sub-lamellar bone mechanics. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015;52:63-71.
21. Terajima M, Perdivara I, Sricholpech M, Deguchi Y, Pleshko N, Tomer KB, et al. Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(33):22636-47.
22. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv A, Pathological anatomy and histopathology*. 1993;423(1):1-11.
23. Hansen LK, Wilhelm J, Fassett JT. Regulation of hepatocyte cell cycle progression and differentiation by type I collagen structure. *Current topics in developmental biology*. 2006;72:205-36.
24. Yeaman C, Grindstaff KK, Hansen MD, Nelson WJ. Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Current biology : CB*. 1999;9(14):R515-7.
25. Liu JK, DiPersio CM, Zaret KS. Extracellular signals that regulate liver transcription factors during hepatic differentiation in vitro. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(2):773-84.
26. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 24):4195-200.
27. Santi PA, Johnson SB. Decellularized ear tissues as scaffolds for stem cell differentiation. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 2013;14(1):3-15.
28. Zhang Y, He Y, Bharadwaj S, Hammam N, Carnagey K, Myers R, et al. Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials*. 2009;30(23-24):4021-8.

29. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annual review of biomedical engineering*. 2011;13:27-53.
30. Aoki K, Saito N. Biocompatibility and Carcinogenicity of Carbon Nanotubes as Biomaterials. *Nanomaterials*. 2020;10(2).
31. Meredith JR, Jin C, Narayan RJ, Aggarwal R. Biomedical applications of carbon-nanotube composites. *Frontiers in bioscience*. 2013;5:610-21.
32. Jain KK. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2008;17(2):89-101.
33. Shidhaye SS, Vaidya R, Sutar S, Patwardhan A, Kadam VJ. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers--innovative generations of solid lipid carriers. *Current drug delivery*. 2008;5(4):324-31.
34. Teradal NL, Jelinek R. Carbon Nanomaterials in Biological Studies and Biomedicine. *Advanced healthcare materials*. 2017;6(17).
35. Oliveira; Md, Poletto; M, Severo TC. Rota química para produção de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite comercial. *Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada*. 2018;3(6):17-20.
36. Wang Y, Li Z, Wang J, Li J, Lin Y. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*. 2011;29(5):205-12.
37. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 1991;354:56-8.
38. Qin LC, Zhao X, Hirahara K, Miyamoto Y, Ando Y, Iijima S. The smallest carbon nanotube. *Nature*. 2000;408(6808):50.
39. Xia T, Li N, Nel AE. Potential health impact of nanoparticles. *Annual review of public health*. 2009;30:137-50.
40. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(3):311-30.
41. Che Abdullah CA, Azad CL, Ovalle-Robles R, Fang S, Lima MD, Lepro X, et al. Primary liver cells cultured on carbon nanotube substrates for liver tissue engineering and drug discovery applications. *ACS applied materials & interfaces*. 2014;6(13):10373-80.
42. Wei J, Lu J, Chen M, Xie S, Wang T, Li X. 3D spheroids generated on carbon nanotube-functionalized fibrous scaffolds for drug metabolism and toxicity screening. *Biomaterials science*. 2019;8(1):426-37.
43. Frazier SB, Roodhouse KA, Hourcade DE, Zhang L. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open glycoscience*. 2008;1:31-9.
44. Rajan N, Habermehl J, Cote MF, Doillon CJ, Mantovani D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature protocols*. 2006;1(6):2753-8.
45. Zhang L, Zhou Q, Song W, Wu K, Zhang Y, Zhao Y. Dual-Functionalized Graphene Oxide Based siRNA Delivery System for Implant Surface Biomodification with Enhanced Osteogenesis. *ACS applied materials & interfaces*. 2017;9(40):34722-35.
46. Aleahmad F, Ebrahimi S, Salmanezhad M, Azarnia M, Jaberipour M, Hoseini M, et al. Heparin/Collagen 3D Scaffold Accelerates Hepatocyte Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;14(4):443-52.
47. Shen L, Hillebrand A, Wang DQ, Liu M. Isolation and primary culture of rat hepatic cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012(64).

48. Long-Cheng Tang, Wan; Y-J, Yan; D, Pei; Y-B, Zhao; L, Li; Y-B, et al. The effect of graphene dispersion on the mechanical properties of graphene/epoxy composites. *Carbon*. 2013;60:16-27.
49. Ando Y. Carbon nanotube: the inside story. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2010;10(6):3726-38.
50. Herbst MH, Macêdo; MIF, Rocco AM. Technology of carbon nanotubes: trends and perspectives of a multidisciplinary area. *Quím Nova*. 2004;27:986-92.
51. Dreyer DR, Park S, Bielawski CW, Ruoff RS. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society reviews*. 2010;39(1):228-40.
52. Dresselhaus MS, Jorio A, Hofmann M, Dresselhaus G, Saito R. Perspectives on carbon nanotubes and graphene Raman spectroscopy. *Nano letters*. 2010;10(3):751-8.
53. Heise HM, Kuckuk R, Ojha AK, Srivastava A, Srivastava V, Asthana BP. Characterisation of carbonaceous materials using Raman spectroscopy: a comparison of carbon nanotube filters, single - and multi - walled nanotubes, graphitised porous carbon and graphite. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2008;40:344-53.
54. de Leon-Martinez PA, Saenz-Galindo A, Avila-Orta CA, Castaneda-Facio AO, Andrade-Guel ML, Sierra U, et al. Ultrasound-Assisted Surface Modification of MWCNT Using Organic Acids. *Materials*. 2020;14(1).
55. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz, Vyvyan JR. *Introdução à espectroscopia* 1979.
56. Sridharan, I.; Kim, T.; Wang, R. Adapting collagen/CNT matrix in directing hESC differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 381(4): 508-12
57. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Developmental cell*. 2010;18(2):175-89.
58. Kuepfer L. Towards whole-body systems physiology. *Molecular systems biology*. 2010;6:409.
59. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Methods in molecular biology*. 2011;697:63-70.
60. Piaskowski K, Zarzycki PK. Carbon-Based Nanomaterials as Promising Material for Wastewater Treatment Processes. *International journal of environmental research and public health*. 2020;17(16).
61. Shannahan JH, Brown JM, Chen R, Ke PC, Lai X, Mitra S, et al. Comparison of nanotube-protein corona composition in cell culture media. *Small*. 2013;9(12):2171-81.
62. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008;14(2):213-21.
63. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nature medicine*. 2010;16(7):814-20.
64. Cassidy JW. Nanotechnology in the Regeneration of Complex Tissues. *Bone and tissue regeneration insights*. 2014;5:25-35.
65. Khan SA, Nelson MS, Pan C, Gaffney PM, Gupta P. Endogenous heparan sulfate and heparin modulate bone morphogenetic protein-4 signaling and activity. *American journal of physiology Cell physiology*. 2008;294(6):C1387-97.
66. Wang Y, Cui CB, Yamauchi M, Miguez P, Roach M, Malavarca R, et al. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology*. 2011;53(1):293-305.
67. Lin H, Clegg DO, Lal R. Imaging real-time proteolysis of single collagen I molecules with an atomic force microscope. *Biochemistry*. 1999;38(31):9956-63.

68. Bass LS, Moazami N, Pocsidio J, Oz MC, LoGerfo P, Treat MR. Changes in type I collagen following laser welding. *Lasers in surgery and medicine*. 1992;12(5):500-5.
69. Hodny Z, Struzinsky R, Deyl Z. Silver staining of collagen type I after sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis: effect of Maillard reaction. *Journal of chromatography*. 1992;578(1):53-62.
70. Podila R, Vedantam P, Ke PC, Brown JM, Rao AM. Evidences For Charge Transfer-Induced Conformational Changes In Carbon Nanostructure-Protein Corona. *The journal of physical chemistry C, Nanomaterials and interfaces*. 2012;116(41):22098-103.
71. Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM. Toxicity testing of nanomaterials. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;745:58-75.
72. Sridharan I, Kim T, Wang R. Adapting collagen/CNT matrix in directing hESC differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;381(4):508-12.
73. Hu X, Li D, Gao Y, Mu L, Zhou Q. Knowledge gaps between nanotoxicological research and nanomaterial safety. *Environment international*. 2016;94:8-23.
74. Che Abdullah CA, Lewis Azad C, Ovalle-Robles R, Fang S, Lima MD, Lepró X, et al. Primary Liver Cells Cultured on Carbon Nanotube Substrates for Liver Tissue Engineering and Drug Discovery Applications. *ACS applied materials & interfaces*. 2014;6(13):10373-80.
75. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology*. 2008;20(2):86-100.
76. Badylak SF, Gilbert TW. Immune response to biologic scaffold materials. *Seminars in immunology*. 2008;20(2):109-16.
77. Ratner BD. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2002;78(1-3):211-8.
78. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:697-715.
79. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005;310(5751):1139-43.
80. Yao L, Phan F, Li Y. Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):109.