

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Biologia Celular**

Nathanael Vieira Medrado

**DESENVOLVIMENTO DE BIOGEL OSTEOINDUTOR**  
**COM NANOPARTÍCULAS PIEZOELÉTRICAS**

Belo Horizonte

2020

Nathanael Vieira Medrado

**DESENVOLVIMENTO DE BIOGEL OSTEOINDUTOR  
COM NANOPARTÍCULAS PIEZOELÉTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende.

Coorientador(a): Dr<sup>a</sup>. Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga

Belo Horizonte

2020

043

Medrado, Nathanael Vieira.

Desenvolvimento de biogel osteoindutor com nanopartículas piezoelétricas [manuscrito] / Nathanael Vieira Medrado. – 2020.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Resende. Coorientador(a): Dra . Érika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga.

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

1. Biologia Celular. 2. Osteoblastos. 3. Osso e Ossos. 4. Colágeno. 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

## ATA DE DEFESA



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

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

NATHANAEL VIEIRA MEDRADO

330/2020  
entrada  
1º/2018  
2018697506

Às **quatorze horas** do dia **28 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**DESENVOLVIMENTO DE BIOGEL OSTEOINDUTOR COM NANOPARTÍCULAS PIEZOELÉTRICAS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dra. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga	UFSJ	Aprovado
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado
Dra. Michele Munk Pereira	UFJF	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: Aprovado  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato 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, 28 de fevereiro de 2020.**

Dr<sup>a</sup>. Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge

Dr<sup>a</sup>. Michele Munk Pereira

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

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG

Erika Cristina Jorge

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Rodrigo R. Resende por ter me recebido em seu laboratório e assim ter me proporcionado todas as oportunidades de aprendizado que tive na universidade.

Agradeço à professora Dra. Érika Alvarenga por ter visto em mim o desejo pela ciência e ter me levado ao universo da pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos.

Minha gratidão ao Jamil pela amizade e companhia no laboratório, por estar sempre presente e auxiliar em tudo.

Sou grato ao meu colega de laboratório Dr. Anderson Kenedy Santos, pela companhia, pelos ensinamentos e por continuar a me auxiliar mesmo quando deixei de fazer parte de suas responsabilidades, nunca me esquecerei disso.

Agradeço à Rebecca Vasconcellos por ter me ensinado desde o princípio da minha trajetória na UFMG, pela paciência em ensinar alguém que nunca tinha entrado em um laboratório de pesquisa e por continuar a fazer parte da minha formação, sou eternamente grato.

Agradeço a Mariana Vieira pela companhia, pelos ensinamentos e por todo o carinho.

Agradeço aos membros do Birbrairlab pela companhia e por terem me recebido após a grande mudança.

Sou grato à todos que conheci na UFSJ, os quais me auxiliaram na experimentação *in vivo*. Vocês passaram a fazer parte da minha história.

Agradeço ao Pedro Henrique por ter me dado a oportunidade de auxiliá-lo em sua iniciação científica e por ter sido um bom amigo.

Com todo o meu ser agradeço à Deus pelo dom da vida e a beleza que ela contém.

Sou grato aos familiares e amigos que me apoiaram e acreditaram em mim.

Minha imensurável gratidão ao meu querido e amado irmão e aos meus maravilhosos pais por serem o meu incentivo e minha alegria, por serem aqueles que verdadeiramente me amam e diariamente demonstram esse amor. Eu os amo de igual maneira e para vocês dedico esse trabalho.

## RESUMO

O tecido ósseo é constituído por três principais tipos celulares denominados osteoclastos, osteócitos e osteoblastos. Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação da matriz extracelular óssea que é constituída em maior parte por colágeno do tipo I e cristais de hidroxiapatita, os quais conferem propriedade piezoelétrica ao tecido ósseo, sendo tal propriedade compreendida como a capacidade de gerar potenciais elétricos em resposta à deformação mecânica. Várias lesões do tecido ósseo exigem a utilização de estratégias terapêuticas de reparo como a implantação de materiais que mimetizem a composição e piezoelectricidade óssea. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi produzir e avaliar o potencial osteoindutor do biogel de colágeno com nanopartículas de titanato de bário. Para isso, realizou-se a extração de colágeno de tendão bovino e colágeno da cauda de rato. Os diferentes tipos de colágeno foram utilizados para produção dos *scaffolds* em associação com as nanopartículas de titanato de bário piezoelétricas. Foi identificado que as nanopartículas não apresentam citotoxicidade para osteoblastos de ratos e que sua associação ao colágeno gera *scaffolds* citocompatíveis. Além disso, os *scaffolds* de colágeno de rato associados às nanopartículas promoveram maturação osteoblástica identificada por meio da maior atividade da enzima fosfatase alcalina e do aumento significativo na expressão de genes relacionados à maturação osteoblástica após 14 dias, como Bglap e Colla1. Além disso, observou-se que o reparo ósseo em ratos foi favorecido no grupo que recebeu o tratamento com colágeno associado às nanopartículas. Portanto, conclui-se que o biogel de colágeno com nanopartículas de titanato de bário é um material biocompatível e osteoindutor com potencial para promover reparo do tecido ósseo.

Palavras-chave: osteoblastos; tecido ósseo; colágeno; titanato de bário; piezoelectricidade.

## ABSTRACT

Bone tissue consists of three main cell types called osteoclasts, osteocytes and osteoblasts. Osteoblasts are the cells responsible for the formation of the extracellular bone matrix that is mainly caused by type I and hydroxyapatite that give piezoelectric property to bone tissue, being this property understood as a capacity to generate electrical potentials in response to mechanical deformations. Several lesions in bone tissue require the use of therapeutic repair strategies, such as the implantation of materials that mimic the bone composition and piezoelectricity. Therefore, the objective of the work was to produce and evaluate the osteoinductive potential of collagen with barium titanate nanoparticles. For this, collagen extraction of bovine tendon and rat tail was performed. The different types of collagen were used to produce scaffolds in association with piezoelectric barium titanate nanoparticles. It was identified that the nanoparticles do not present cytotoxicity to rat osteoblasts and their association with collagen generates cytocompatible scaffolds. In addition, the rat collagen scaffolds associated with the nanoparticles promote osteoblastic maturation identified by the increased activity of the enzyme alkaline phosphatase and by the increased expression of genes related to osteoblastic maturation in 14 days, such as *Bglap* and *Colla1*. In addition, the bone repair in rats was favored in the group that received treatment with collagen associated with nanoparticles. Therefore, collagen biogel with barium titanate nanoparticles is a biocompatible and osteoinductive material with the potential to bone tissue repair.

Keywords: osteoblasts; bone tissue; collagen; barium titanate; piezoelectricity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do tecido ósseo	18
Figura 2: Imagem ilustrativa da origem da linhagem osteoblástica no nicho ósseo	19
Figura 3: Figura ilustrativa dos principais fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação osteoblástica	21
Figura 4: Imagem ilustrativa de um <i>scaffold</i> de colágeno	26
Figura 5: Imagem ilustrativa da estrutura das fibras de colágeno	28
Figura 6: Imagem ilustrativa da mineralização por meio de vesículas de matriz	29
Figura 7: Imagem ilustrativa da fase cristalina cúbica simétrica	30
Figura 8: Imagem ilustrativa das fases cristalinas assimétricas de titanato de bário	31
Figura 9: Extração de colágeno bovino	36
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida.	37
Figura 11: Obtenção de calvária de ratos Wistar neonatos	38
Figura 12: Modelo esquemático do processo de extração de osteoblastos	39
Figura 13: Preparo para osteotomia	47
Figura 14: Etapas da experimentação <i>in vivo</i> .	48
Figura 15: Análise topográfica das nanopartículas de titanato de bário por AFM	49
Figura 16: Análise topográfica das Nanopartículas de Titanato de Bário por MEV	50
Figura 17: Gráfico representando análise qualitativa da composição química das NPTB por EDS.	51
Figura 18: Gráfico representativo da distribuição de tamanho obtida por análise DLS	51
Figura 19: Análise topográfica e perfil condutor das Nanopartículas de Titanato de Bário obtida por AFM e EFM de uma nanopartícula	52
Figura 20: Espectro Raman das NPTB.	53

Figura 21: Imagem de osteoblastos isolados da calvária de ratos Wistar neonatos cultivados em meio de cultura DMEM suplementado	53
Figura 22: Imagem representativa de coloração por <i>Alizarin Red</i> para identificação de mineralização após 14 dias de cultivo.	54
Figura 23: Atividade enzimática de fosfatase alcalina em osteoblastos após 14 dias de cultivo	55
Figura 24: Análise da produção de colágeno após 14 dias de cultivo.	56
Figura 25: <i>Heatmap</i> de genes relacionados à maturação osteoblástica.	57
Figura 26: Representação gráfica da análise estatística do perfil de expressão de genes relacionados à maturação osteoblástica em 3,7 e 14 dias	58
Figura 27: Representação gráfica da viabilidade celular frente às diferentes concentrações de NPTB	49
Figura 28: Imagem representativa de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de 10-15%.	60
Figura 29: Espectroscopia Raman das amostras de colágeno bovino e de rato.	61
Figura 30: MEV dos diferentes <i>scaffolds</i> .	62
Figura 31: Representação gráfica da viabilidade celular frente aos diferentes <i>scaffolds</i> .	63
Figura 32: Microscopia de fluorescência para análise da viabilidade Celular por meio de <i>LIFE/DEAD</i> .	64
Figura 33: Microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos sobre os diferentes <i>scaffolds</i> .	65
Figura 34: Atividade de fosfatase alcalina	66
Figura 35: <i>Heatmap</i> de genes relacionados à maturação osteoblástica nos <i>scaffolds</i> .	67
Figura 36: Análise estatística do perfil de expressão gênica em 7 dias.	68

Figura 37: Análise estatística do perfil de expressão gênica em 14 dias.	69
Figura 38: Análise macroscópica da área da lesão óssea após 14 dias	70
Figura 39: Análise microscópica da área da lesão óssea após 14 dias	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADAMTS – *A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs*, desintegrina e metaloproteinase com motivo trombospondina
- AFM – *Atomic Force Microscopy*, Microscopia de força atômica
- ATP – Adenosina trifosfato
- ALP – *Alkaline Phosphatase*, Fosfatase alcalina
- BaTiO<sub>3</sub> – Titanato de bário
- Bglap – *Bone Gla Protein*, Proteína Gla óssea
- BMP - *Bone Morphogenic Protein*, Proteína morfogênica óssea
- CBP – *CREB-binding protein*, Proteína de ligação à CREB
- CEUA – Comissão de ética na utilização de animais
- CREB – *cAMP-response element-binding protein*, Proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP
- DLS – *Dynamic light scattering*, Espalhamento dinâmico de luz
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Meio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DNAc – DNA complementar
- EDS – *Energy Dispersive Spectrometry*, espectrometria de energia dispersiva
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*, ácido etilendiamino tetra-acético
- EFM – *Electric Force Microscopy*, Microscopia de força elétrica
- ERK – *Extracellular signal-regulated kinases*, Quinase regulada por sinal extracelular
- FGF – *Fibroblast Growth Factor*, Fator de crescimento fibroblástico
- GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HA - Hidroxiapatita

IL - Interleucina

MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*, Proteína-quinases ativadas por mitógenos

MEC – Matriz Extracelular

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

mg – miligrama

mL – mililitro

mm – milímetro

mV - milivolt

NBT- BCIP –*Nitro Blue TetrazoliumChloride / bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt*

NPTB – Nanopartículas de titanato de bário

OsO<sub>4</sub> – Tetróxido de ósmio

OSX - Osterix

PBS – *Phosphate Buffer Saline*, Tampão salino fosfato

PCR – *Polymerase Chain Reaction*, Reação em cadeia da polimerase

PDGF – *Platelet Derived Growth Factor*, Fator de crescimento derivado de plaquetas

PFA – Paraformaldeído

PTH – Paratormônio

qRT -PCR – *Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*, quantitativa transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase

Runx2 – *Runt related transcription factor-2*, Fator de transcrição relacionado à Runt -2

SDS – Sódio Dodecil Sulfato

SFB – Soro Fetal Bovino

SOX9 – *SRY (sex determining region Y)-box 9*

TGF-  $\beta$  - *Transforming growth factor- $\beta$* , Fator de Crescimento e Transformação-  $\beta$

UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFSJ – Universidade Federal de São João Del Rei

VEGF- *Vascular Endothelial Growth Factor*, Fator de crescimento do endotélio vascular

$\mu\text{g}$  – micrograma

$\mu\text{l}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1 Tecido ósseo .....	17
1.2 Organização do tecido ósseo .....	18
1.3 Osteogênese .....	19
1.4 Diferenciação osteogênica .....	20
1.5 Lesão óssea e processo de reparo .....	23
1.6 Estratégias terapêuticas de reparo ósseo .....	24
1.7 Colágeno e processo de mineralização .....	26
1.8 Nanopartículas de titanato de bário .....	29
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo geral .....	32
2.2 Objetivos específicos .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Cuidados éticos .....	33
3.2 Nanopartículas de titanato de bário .....	33
3.2.1 Microscopia de força atômica .....	33
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura e EDS .....	34
3.2.3 Espectroscopia Raman .....	34
3.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta .....	34
3.2.5 Microscopia de força elétrica .....	35
3.3 Colágeno .....	35
3.3.1 Extração de colágeno bovino .....	35

3.3.2	Extração de colágeno de rato .....	36
3.3.3	Concentração do colágeno .....	36
3.3.4	Análise do colágeno por eletroforese .....	37
3.4	Osteoblastos .....	37
3.4.1	Isolamento de osteoblastos .....	38
3.4.2	Maturação osteoblástica .....	39
3.4.3	Avaliação da formação de nódulos de mineralização .....	40
3.4.4	Avaliação da atividade de fosfatase alcalina .....	40
3.4.5	Quantificação de colágeno produzido por osteoblastos .....	41
3.4.6	Expressão gênica .....	41
3.4.6.1	Extração de RNA total .....	41
3.4.6.2	Transcrição reversa e PCR em tempo real.....	42
3.5	Citotoxicidade das nanopartículas .....	43
3.6	Preparo dos <i>scaffolds</i> de colágeno.....	43
3.7	Análise dos <i>scaffolds</i> por MEV .....	44
3.8	Biocompatibilidade dos <i>Scaffolds</i> .....	44
3.8.1	Viabilidade celular com <i>Alamar Blue</i> .....	44
3.8.2	Viabilidade celular com <i>LIFE/DEAD</i> ... ..	44
3.8.3	Morfologia celular por MEV .....	45
3.9	Maturação osteoblástica nos <i>scaffolds</i> .....	45
3.9.1	Fosfatase alcalina .....	45
3.9.2	Expressão gênica .....	46
3.10	Experimentação <i>in vivo</i> .....	46

3.1.1	Análise estatística .....	48
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
4.1	Caracterização das nanopartículas de titanato de bário.....	49
4.2	Estudos <i>in vitro</i> .....	53
4.2.1	Caracterização da cultura primária de osteoblastos.....	54
4.2.2	Expressão gênica.....	56
4.3	Biocompatibilidade das nanopartículas.....	59
4.4	Caracterização dos biogéis de colágeno.....	59
4.4.1	Eletroforese .....	59
4.4.2	Espectroscopia Raman do colágeno .....	61
4.4.3	Caracterização topográfica dos <i>scaffolds</i> de colágeno por MEV.....	61
4.5	Biocompatibilidade dos <i>scaffolds</i> .....	63
4.6	Maturação osteoblástica nos <i>scaffolds</i> - Osteoindução .....	65
4.7	Reparo ósseo – Aplicação <i>in vivo</i> .....	69
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos ocorreu um notável desenvolvimento na área de biomateriais para aplicação em reparo tecidual. Grande parte desses biomateriais visa à criação de um microambiente tridimensional que permita a migração, proliferação e diferenciação de células relacionadas ao processo de reparo. As lesões no tecido ósseo são grandes alvos para utilização de biomateriais tendo em vista que, apesar da capacidade de autorreparação desse tecido, na presença de comorbidades ou em lesões extensas observa-se atraso ou ineficácia no processo de reparo (1).

Com a finalidade de favorecer esse processo, biomateriais como o colágeno são frequentemente utilizados na produção de *scaffolds* para aplicação em tecido ósseo, tendo em vista sua abundância esse tipo de tecido. Além disso, a associação de colágeno com materiais em escala nanométrica pode conferir ao *scaffold* características químicas, estruturais e físicas semelhantes às encontradas naturalmente nos ossos (2).

Tendo em vista tais características físicas, atenção tem sido dada para o desenvolvimento de biomateriais que além do aspecto estrutural e químico, também mimetizem o ambiente ósseo eletricamente ativo. Essa abordagem é investigada visando à capacidade dos potenciais elétricos, presentes naturalmente nos tecidos biológicos, em gerar manutenção da atividade celular (3, 4).

Além disso, biomateriais para reparo ósseo devem ser citocompatíveis, apresentando capacidades de osteoindução e osteocondução, as quais permitem a adesão e maturação das células ósseas ao responderem aos estímulos provenientes do biomaterial (5, 6). Sendo assim, acredita-se que a associação de colágeno com nanopartículas eletricamente ativas possa gerar um *scaffold* com potencial de induzir a diferenciação e/ou maturação das células responsáveis pela formação óssea, bem como a indução do processo de reparo ósseo *in vivo*.

## 1.1 Tecido ósseo

Os ossos compõem o sistema esquelético e são responsáveis por sustentar o peso corporal, proteger órgãos internos, permitir a locomoção e absorção de impactos, armazenar grande parte dos íons minerais, abrigar a medula óssea para a produção de células sanguíneas e produzir moléculas com ação endócrina (7, 8).

O tecido ósseo é constituído por três principais tipos celulares, nomeados osteoclastos, osteoblastos e osteócitos(7). Os osteoclastos são células grandes multinucleadas provenientes da fusão de células da linhagem de monócitos/macrófagos e atuam no processo de modelamento e remodelamento ósseo por meio da degradação da matriz extracelular (9) enquanto os osteoblastos derivam de células de origem mesenquimal sendo responsáveis pela síntese de Matriz Extracelular (MEC) (10).

Os osteoblastos maduros são células que apresentam morfologia cuboidal com citoplasma muito basófilo, núcleo volumoso, complexo de golgi e retículo endoplasmático bem desenvolvidos além de abundante conteúdo de mitocôndrias, o que caracteriza sua grande atividade de síntese de MEC óssea (11, 12).

A MEC do tecido ósseo é constituída por conteúdo inorgânico em sua maior parte formado por íons fosfato ( $P_i$ ) e cálcio ( $Ca^{2+}$ ) na forma de cristais de hidroxiapatita (HA), e também por conteúdo orgânico, composto por diversas proteínas das quais 90% compreendem moléculas de colágeno do tipo I. O colágeno é um importante marcador da atividade de síntese dos osteoblastos bem como do processo de maturação dessas células (13) além de ser o constituinte da MEC responsável por conferir ao tecido certo grau de elasticidade (14). As glicoproteínas osteopontina, osteonectina e osteocalcina, também são produzidas por osteoblastos para formar a MEC, porém em proporções reduzidas em relação ao colágeno (15). Proteoglicanos e glicosaminoglicanos como sulfato de condroitina e hialuronana também compõem a MEC e associam-se com o colágeno e as demais glicoproteínas servindo de arcabouço para deposição do conteúdo inorgânico do tecido (16, 17).

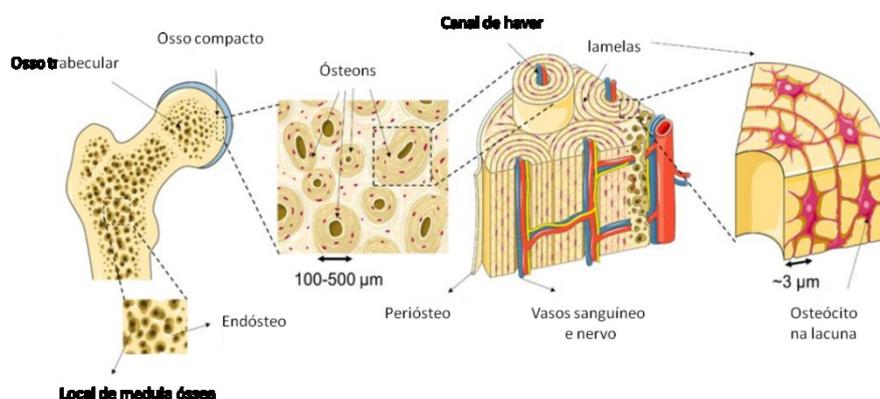
Após sintetizarem a MEC uma parte dos osteoblastos sofre apoptose e outra transforma-se em células achatadas localizadas sobre a superfície óssea onde são chamadas de células de revestimento ósseo (*bone line cells*) (18).No entanto grande parte dos osteoblastos fica aprisionada no interior da matriz orgânica produzida por eles mesmos e diferenciam-se

em osteócitos, quando então sofrem alterações morfofuncionais como diminuição do volume celular e a projeção de vários processos citoplasmáticos que através de *gap junctions*, formadas principalmente por conexina 43, mantêm uma rica rede de comunicação com outros osteócitos, denominada rede osteocítica (12). Os osteócitos apresentam importante função na homeostase óssea tendo em vista a sua capacidade de detectar estímulos físicos como campos elétricos e forças mecânicas para transformá-los em uma resposta bioquímica por meio da ativação de diferentes receptores e vias de sinalização celular que resultam na coordenação do remodelamento ósseo por osteoblastos e osteoclastos (19).

## 1.2 Organização do tecido ósseo

Tendo em vista a deposição de MEC e sua mineralização, o tecido ósseo é classificado em compacto/cortical ou trabecular/esponjoso de acordo com sua organização. O osso compacto é tipicamente mais rígido sendo encontrado prioritariamente nas diáfises de ossos longos e na parte externa da maioria dos ossos como forma de revestimento e proteção para o tecido ósseo trabecular. O osso compacto representa cerca de 80% do esqueleto, enquanto o osso esponjoso representa os 20% restantes, no entanto devido sua porosidade o osso trabecular possui maior área de superfície (20).

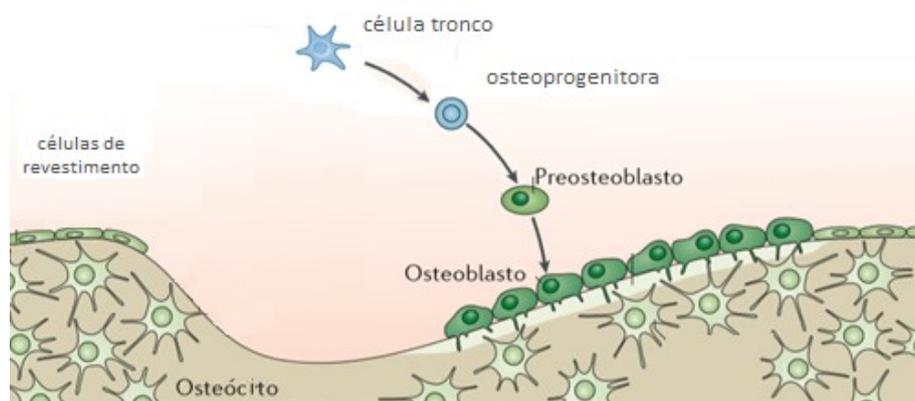
O osso compacto caracteriza-se por sua organização distinta em sistemas de *havers* nos quais se identificam canais para a passagem de vasos sanguíneos e linfáticos assim como de pequenas fibras nervosas. Tais canais são circundados pelo tecido conjuntivo da MEC mineralizada de forma concêntrica, formando estruturas conhecidas como lamelas anelares onde encontram-se os osteócitos. O conjunto de lamelas anelares e do canal que elas circundam forma uma unidade óssea denominada *ósteon* (21). **Figura 1.**



**Figura 1. Organização do tecido ósseo.** Modificado de LOPES *et al*, 2018 (21).

No interior dos ossos longos e nas regiões entre as trabéculas do tecido ósseo esponjoso encontra-se a medula óssea, um tecido conjuntivo que abriga células tronco hematopoiéticas e células tronco mesenquimais (22-24).

As células tronco são definidas como células capazes de se autorrenovarem permanecendo em um estado indiferenciado e quando devidamente estimuladas originarem diferentes linhagens celulares(25-27). As células tronco mesenquimais dão origem as células osteoprogenitoras (28) as quais são principalmente encontradas no tecido conjuntivo que reveste os ossos, denominado periósteo, assim como na medula óssea (29). Tais células são responsáveis pela geração de osteoblastos não somente durante o desenvolvimento como também nas situações de reparo (29), sendo pertencentes à linhagem osteoblástica que compreende células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos maduros, *bone line cells* e osteócitos (11). **Figura 2.**



**Figura 2. Imagem ilustrativa da origem da linhagem osteoblástica no nicho ósseo.** Modificado de LONG, 2012 (11).

### 1.3 Osteogênese

A formação óssea ocorre por meio de dois processos denominados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação endocondral ocorre durante o desenvolvimento dos esqueletos apendicular e axial (30, 31). Nesse tipo de ossificação as células tronco mesenquimais provenientes de diferentes locais no embrião migram para as áreas de desenvolvimento ósseo onde sofrem condensação de grande densidade celular. Dentro de tais condensações, tem-se a formação de tecido cartilaginoso a partir da diferenciação das células mesenquimais em células típicas de cartilagem, denominadas condrócitos (32).

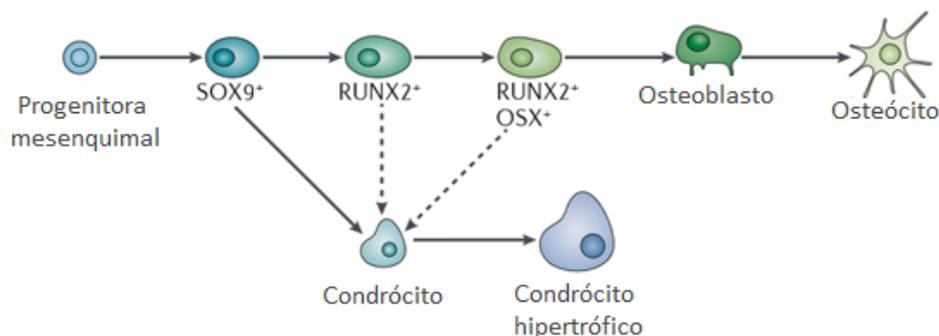
Os condrócitos do molde cartilaginoso tornam-se células hipertróficas não proliferativas que sofrem apoptose enquanto o tecido em que se encontram é invadido por células endoteliais, osteoprogenitoras e osteoclastos provenientes do pericôndrio, a camada de tecido conjuntivo que reveste o molde cartilaginoso (31). Os osteoclastos, que nesse contexto também são chamados de condroclastos, reabsorvem o molde cartilaginoso enquanto as células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos maduros que iniciam a síntese de MEC óssea (33). Têm sido apontado que a geração de osteoblastos também ocorre por meio de transdiferenciação de condrócitos do molde cartilaginoso favorecendo a formação do pool de células ósseas (34, 35).

A formação óssea também ocorre nos locais de condensação mesenquimal por meio da diferenciação direta das células tronco mesenquimais em osteoblastos, que dão início ao processo de ossificação denominado intramembranoso. Nesse processo não há formação de molde cartilaginoso prévio e seu desenvolvimento ocorre em partes da clavícula e em regiões do neuro- e viscerocrânio (32, 36).

#### **1.4 Diferenciação osteogênica**

Todos os processos de diferenciação de células ósseas envolvem alterações em diferentes vias de sinalização com conseqüente aumento ou diminuição da atividade de fatores de transcrição como SOX9 (*Sex determining region Y – box 9*), que possui maior atividade transcricional em células osteoprogenitoras (11).

Um fator de transcrição extremamente importante para geração de células comprometidas com a linhagem osteoblástica é a proteína Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*). A ativação deste fator de transcrição promove a síntese de diferentes moléculas, como colágeno, osteocalcina e conexina 43, importantes para o desenvolvimento, diferenciação e homeostase óssea (20). Diferentes vias de sinalização, como das proteínas Notch, BMP (*Bone Morphogenic Protein*), Wnt e *hedgehog* influenciam a produção e atividade de Runx2 assim como de outros fatores transcricionais como OSX (*osterix*), normalmente mais expresso nas células que se encontram em estágio avançado no processo de diferenciação osteogênica (11). **Figura 3.**



**Figura 3. Figura ilustrativa dos principais fatores de transcrição envolvidos com a diferenciação osteoblástica.** Modificado de LONG, 2012 (11).

Durante a diferenciação osteogênica, as proteínas Wnts atuam canonicamente por meio da ligação com receptores Frizzled e seus co-receptores LRPs (*LDL receptor-related proteins*) que são fosforilados por CK1 $\alpha$  (*casein kinase*) e por GSK3 $\beta$ , recrutando proteínas Dishevelled (Dvl) na membrana celular. Isto gera estabilização e acúmulo  $\beta$ -catenina no citoplasma, evitando sua degradação nos proteossomos. Em seguida a  $\beta$ -catenina transloca para o núcleo formando um complexo com TCF (T-cell factor) e LEF (*lymphoid enhancer factor*) para induzir expressão gênica (37). Proteínas Wnt1, 3, 3a e 8 já mostraram ser importantes reguladores do comprometimento com a linhagem osteoblástica atuando por via canônica através de  $\beta$ -catenina, embora Wnt 4, 5 e 11 também se relacionem com o processo de diferenciação osteogênica por via não canônica (independente de  $\beta$ -catenina) através de sinalização de cálcio (38, 39).

A via de sinalização Hedgehog também exerce importante papel na osteogênese especialmente no processo de ossificação endocondral. Por meio dos receptores Patched homologue 1 (PATCH1) os ligantes Hedgehog ativam a proteína SMO inibindo sua atividade repressora, o que regula fatores de transcrição da família GLI. A ausência de ligantes hedgehog gera inibição exercida pela proteína GLI3, enquanto a presença deles permite a ativação de GLI2, a qual atua induzindo a osteogênese (40).

A osteogênese também sofre regulação por meio da fosforilação exercida pelas proteínas p38MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) e ERK (*Extracellular signal-regulated Kinases*) envolvidas com as vias de sinalização de BMPs assim como de TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) que é conhecido por gerar quimiotaxia e induzir a diferenciação inicial de células osteoprogenitoras (41).

As proteínas TGF- $\beta$  atuam sobre receptores tetraméricos que geram a transdução de sinal por meio da fosforilação de proteínas Smads2 e 3 que ao formarem um complexo com smad4 migram para o núcleo e recrutam cofatores transcricionais como p300 e *CREB-binding protein* (CBP). De forma semelhante, as proteínas BMP atuam gerando a ativação de Smads 1, 5 e 8 que ao complexarem com Smad 4 também migram para o núcleo para induzir a transcrição de genes envolvidos com a osteogênese, como Runx2 (41, 42). Ambos os tipos de ligantes, BMPs e TGF- $\beta$ , também atuam por meio de via independente de Smads que está envolvida com a ativação de proteínas quinases p38 e ERK 1/2 cuja atividade também induz a expressão de genes do programa osteogênico (41, 43).

Contraopondo a indução osteogênica exercida pelas diferentes vias, a sinalização NOTCH atua inibindo a atividade transcricional de Runx2 em células comprometidas com a linhagem osteoblástica, o que gera aumento no número de osteoblastos imaturos. Tal característica se dá devido o potencial de Runx2 em induzir a maturação de osteoblastos ao promover a saída do ciclo celular e suprimir a continuidade da proliferação(44). Assim, diferentes vias de sinalização atuam promovendo a diferenciação osteogênica e maturação de osteoblastos por meio de uma complexa regulação da expressão e atividade transcricional de Runx2.

Pesquisas *in vitro* que visam estudar o processo de diferenciação osteogênica utilizam diferentes fatores para promover o comprometimento e a maturação celular. Dentre os comumente utilizados, encontram-se o ácido ascórbico, o  $\beta$ -glicerofosfato e a dexametasona (45-47). A dexametasona é um glicocorticoide que na diferenciação de osteoblastos já mostrou atuar por meio da via de sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina ao promover o transporte de  $\beta$ -catenina para o núcleo e induzir a expressão de Runx2 (48). No entanto, o potencial osteoindutor da dexametasona é variável quanto à concentração utilizada. Em baixas doses a dexametasona tem potencial para induzir diferenciação osteogênica de células tronco, enquanto que em maior concentração gera inibição da diferenciação e da formação de osteoblastos maduros (49). De semelhante modo a dexametasona exerce efeito negativo nos ossos de pacientes tratados cronicamente, levando ao quadro de osteoporose induzida por glicocorticoide. Assim, para induzir osteogênese em níveis de glicocorticoides próximos ao fisiológico, têm-se proposto a concentração de 10nM para diferenciação e maturação *in vitro* de células de linhagem osteoblástica (50).

Durante o processo de maturação de osteoblastos há uma importante produção de MEC. O ácido ascórbico exerce sua função neste contexto como cofator enzimático no processo de síntese de colágeno. Na ausência de ácido ascórbico, as cadeias na molécula de colágeno não se estruturam corretamente afetando a organização e qualidade da MEC óssea (51-53). Tendo em vista que osteoblastos são responsáveis pela síntese de colágeno tipo I no tecido ósseo, e que este compreende a maior porção orgânica do tecido, o ácido ascórbico tem sido utilizado para favorecer o processo de formação óssea em estudos de diferenciação osteogênica *in vitro* (54, 55), sendo a concentração indicada 50µg/ml (56).

De semelhante modo, para a formação de MEC óssea, a molécula de β-glicerofosfato vem sendo empregada com a finalidade de fornecer substrato para geração de íons fosfato. A concentração de 2mM tem sido proposta para favorecer o processo de mineralização mediado por osteoblastos. Essas células produzem grande quantidade de fosfatase alcalina (ALP) que ao agir em seus substratos como adenosina trifosfato (ATP), β-glicerofosfato e pirofosfato (PPi) geram íons Pi que associados à íons Ca<sup>2+</sup> formam as estruturas cristalinas de HA que se depositam na matriz orgânica colagenosa (56). Além disso, é conhecida a importância de íons Pi como parte de vias de sinalização de proteínas quinases como ERK, induzindo a expressão de genes que codificam as proteínas osteopontina e BMP2 (57, 58).

### **1.5 Lesão óssea e processo de reparo**

As fraturas estão entre as lesões mais frequentes no sistema musculoesquelético, e embora o tecido ósseo apresente capacidade regenerativa, o reparo de lesões ósseas depende de condições biológicas e mecânicas adequadas (59) sendo influenciado pela presença de comorbidades como diabetes (60) e doenças reumáticas (61), presença de infecção (62), severidade do trauma ao tecido ósseo e tecidos moles adjacentes, bem como das técnicas utilizadas para a fixação, tipo de material utilizado e realinhamento dos fragmentos ósseos (59).

O processo de reparo ósseo apresenta ativação de fatores e mecanismos de sinalização que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário como as diversas vias reguladas por proteínas BMP (63, 64), Wnt (65), TGF-β, *hedgehog*, fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2), paratormônio (PTH) e proteína relacionada ao PTH (66).

Após a lesão, o rompimento de vasos sanguíneos do próprio osso e dos tecidos moles ao redor geram extravasamento de plasma que associado ao recrutamento de leucócitos por

meio dos sinais provenientes da lesão tecidual causam o início da fase inflamatória na qual identifica-se aumento do volume tecidual com a presença de hematoma e estado hipóxico (67). A fase inflamatória, cujo pico em ratos ocorre por volta de 7 dias após injúria (59), continua com o recrutamento de neutrófilos (68), seguido de macrófagos e posteriormente por linfócitos (69).

Em seguida, inicia-se o processo de reparo no qual novos vasos sanguíneos são formados por células endoteliais permitindo o aumento nos níveis de oxigênio na região do hematoma (70). Nessa região ocorre o recrutamento de células progenitoras para originar condrócitos que passam a compor um calo de tecido cartilaginoso que é caracterizado por apresentar pouca rigidez. Os condrócitos no calo progridem para o estado hipertrófico à medida que a MEC torna-se mineralizada e de forma semelhante ao que ocorre no desenvolvimento embrionário os condrócitos hipertróficos sofrem apoptose e o tecido cartilaginoso gradativamente é reabsorvido por osteoclastos e substituído por tecido ósseo constituindo o chamado calo duro. Na fase seguinte o tecido do calo sofre contínuo remodelamento em um processo mediado por osteoclastos reabsorvendo e osteoblastos formando tecido, sendo que o remodelamento interno do calo permite o espaço medular ser retomado e o tecido medular hematopoiético ser restabelecido (71, 72).

## **1.6 Estratégias terapêuticas de reparo ósseo**

Em condições patológicas como osteoporose e necrose isquêmica a capacidade fisiológica do tecido em gerar reparo ósseo está prejudicada (73, 74). Tais condições exigem abordagens que favoreçam o processo de remodelamento e reparo de modo otimizado. Estratégias como o uso de FGF (75), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (76), fatores morfogênicos como proteínas BMP (77) e terapia com PTH (78) já tem sido relatadas (79). No entanto, apesar das diferentes abordagens e dos recentes avanços, a utilização de autoenxertos é atualmente o padrão ouro nos procedimentos de tentativa de reparo ósseo apresentando baixo risco de infecção, embora esteja envolvido com o desenvolvimento de morbidades associadas devido a submissão do paciente a outra lesão para obtenção do enxerto (80).

Assim, para auxiliar o processo de reparo substitutos ósseos têm sido desenvolvidos (81). Entre eles encontram-se os materiais metálicos, amplamente utilizados para fixação e substituição de segmentos ósseos (82) e aqueles utilizados para produção de *scaffolds* como

as cerâmicas (83) e os biomateriais produzidos por meio da engenharia de tecidos (84) que tem por finalidade desenvolver substitutos funcionais para danos teciduais (85).

Uma variedade de materiais tem sido estudada para o tratamento de lesões em diferentes órgãos e tecidos como coração, (86) músculo esquelético (87), tendão (88), meniscos (89), ossos (90) e cartilagem articular (91).

Como características ideais, tem-se proposto que os *scaffolds* devem apresentar a capacidade de preencher o espaço onde será introduzido, fixar-se permitindo a integração com os tecidos ao redor e ser biocompatível não induzindo imunogenicidade e inflamação. Além disso, os *scaffolds* devem mimetizar o tecido biológico possuindo propriedades biomecânicas semelhantes às dele, permitindo a adesão e migração celular assim como o fluxo de nutrientes, além de serem biodegradáveis levando à sua substituição pelo tecido do hospedeiro, reestabelecendo a função tecidual (92).

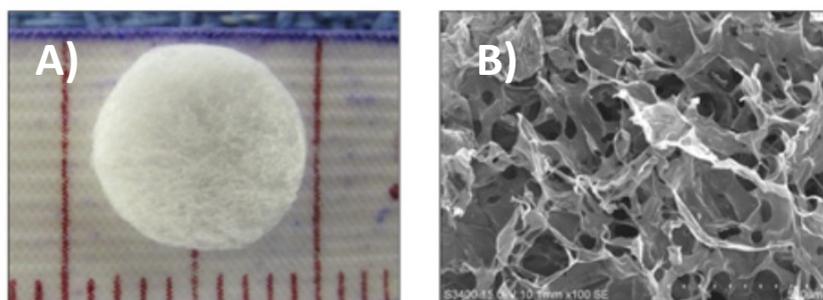
A biocompatibilidade e biodegradabilidade dos *scaffolds* são importantes fatores para a eficácia de sua utilização. O uso de materiais com baixa biocompatibilidade pode gerar uma resposta imune exacerbada que afetará o processo de reparo. De forma semelhante ao processo fisiológico, na presença de materiais implantados os neutrófilos são recrutados para iniciar atividade fagocítica, liberação de espécies reativas de oxigênio e degradação do material por meio de proteases. Tal atividade gera o recrutamento de monócitos e macrófagos cujo fenótipo M1 pró-inflamatório está presente nos estágios iniciais da resposta fisiológica. Durante a progressão da resposta inflamatória, a imunomodulação por meio das moléculas TGF -  $\beta$ , prostaglandina E2, interleucina (IL)-10, IL-4 e IL-13 leva os macrófagos à apresentarem o fenótipo M2 podendo atuar promovendo reparo do tecido e imunomodulação (93). Macrófagos em fenótipo M2 geram o recrutamento de fibroblastos, produção de MEC e formação de vasos sanguíneos promovidos pela liberação de FGF, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), PDGF e TGF- $\beta$  (93).

A ausência de biocompatibilidade dos materiais implantados e a incapacidade dos macrófagos exercerem fagocitose, tendo em vista as diferentes composições e tamanhos, prejudica a formação de MEC e gera a liberação de fatores pró-fibróticos gerando a encapsulação do material que pode levar a perda de sua funcionalidade (93).

Sendo assim, o *scaffold* ideal para o reparo do tecido ósseo deve ser biocompatível, osteocondutor e osteoindutor. A osteocondutividade é compreendida como a capacidade das

células ósseas sofrerem adesão e proliferação no *scaffold* enquanto a osteoindução está relacionada ao potencial do material em questão gerar a diferenciação de células precursoras da linhagem osteoblástica ou a manutenção de células em estágio mais avançado no fenótipo osteogênico (92). Vários materiais tem sido estudados para utilização de forma isolada ou em associação com enxertos para reparo ósseo, como os materiais cerâmicos compostos por fosfato $\beta$  - tricálcico e a HA(94-96) sendo que ambos têm sido empregados para produção de *scaffolds* na forma de biogéis (97, 98).

Os biogéis são grandes candidatos para aplicação em regeneração tecidual por apresentarem as características favoráveis de um *scaffold* para formação de uma estrutura tridimensional que mimetiza o tecido biológico e que permite a adesão, proliferação e migração das células de forma mais fidedigna ao que ocorre *in vivo* (99), além de apresentarem a possibilidade de serem injetáveis, sendo esse um processo menos invasivo (100). Vários materiais tem sido utilizados para produção de biogéis que estimulem a osteogênese, como quitosana (101),alginato (102) e colágeno (103). **Figura 4.**



**Figura 4. Imagem ilustrativa de um scaffold de colágeno.** A) Scaffold macroscopicamente, B) microscopia eletrônica de varredura do scaffold. Modificado de CHAN et al, 2016 (104).

### 1.7 Colágeno e processo de mineralização

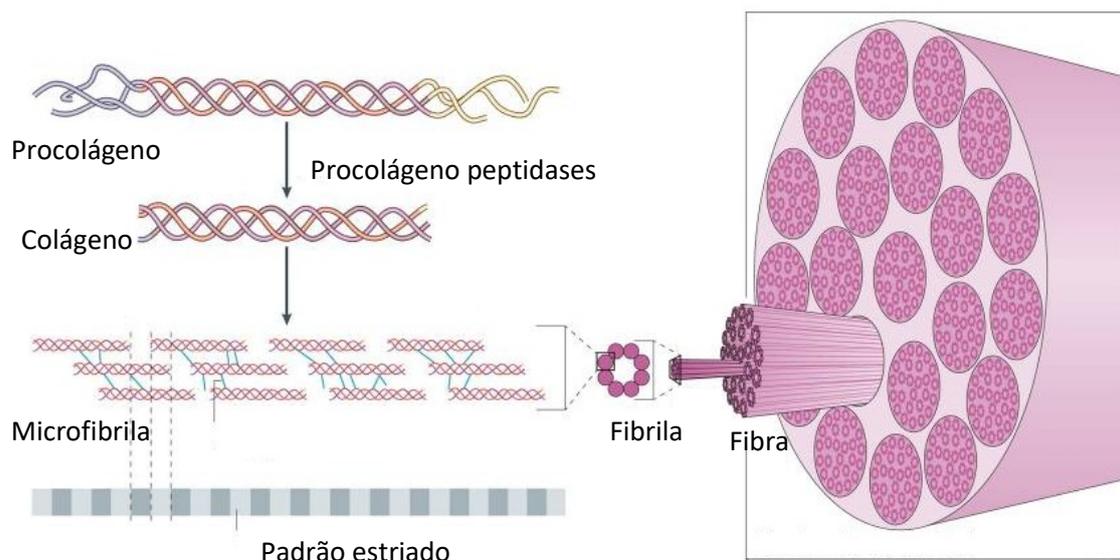
Os *scaffolds* de colágeno já mostraram favorecer significativo efeito no processo de reparo ósseo (105), apresentando biocompatibilidade, biodegradabilidade e excelente propriedade mecânica especialmente quando associados com outros materiais como a HA (106).

De forma geral a estrutura das moléculas de colágeno é constituída por três peptídeos de cadeias alfa ( $\alpha$ ) que formam homotrímeros ou heterotrímeros. Já foram identificadas mais de 40 tipos de cadeias  $\alpha$  em humanos que dão origem aos 28 tipos de proteínas colágenas já descritas (107, 108).

A principal característica estrutural das moléculas de colágeno compreende a tripla hélice formada pelos tripeptídeos nos quais se identifica uma sequência de aminoácidos Gly – X – Y que se repete em uma ou mais regiões da molécula (109). Ao serem sintetizados no retículo endoplasmático rugoso (RER) os aminoácidos prolina da posição X na sequência Gly-X-Y são hidroxilados por prolil-hidroxilases enquanto as lisinas da posição Y são hidroxiladas por lisil hidroxilases. Os resíduos de lisina também sofrem glicosilação por meio da ação das enzimas pró-colágeno galactosiltransferase 1 e glicosiltransferase 1(110). Em seguida os pró-peptídeos associam-se para formação de pró-colágeno com a estruturação da tripla hélice sendo iniciada pelos extremos pró-peptídeos COOH- quando proteínas dissulfeto isomerases auxiliam a formação de bandas dissulfeto intermoleculares e intramoleculares (111, 112).

As moléculas de pró-colágeno formadas no RER são direcionadas para o complexo de golgi onde sofrem empacotamento em vesículas para serem transportadas ao meio extracelular. Apesar de inicialmente acreditar-se que o processamento seguinte acontecia apenas na MEC, têm-se mostrado que tal processamento pode ser iniciado no caminho entre o complexo de golgi e projeções da membrana plasmática denominadas *fibripositors* (113).

O processamento do pró-colágeno no meio extracelular ou nas projeções da membrana se dá por meio de clivagem dos extremos pró-peptídeos COOH- e NH<sub>2</sub>- através da ação de metaloproteinases com motivo trombospondina (ADAMTS) (114) e BMP1(115). O pró-colágeno clivado origina as moléculas de colágeno que se associam formando microfibrilas em um padrão de periodicidade que confere a característica estriada da molécula. Em seguida as microfibrilas agrupam-se para estruturação de fibrilas que posteriormente associam-se formando densas fibras de colágeno (111). **Figura 5.**



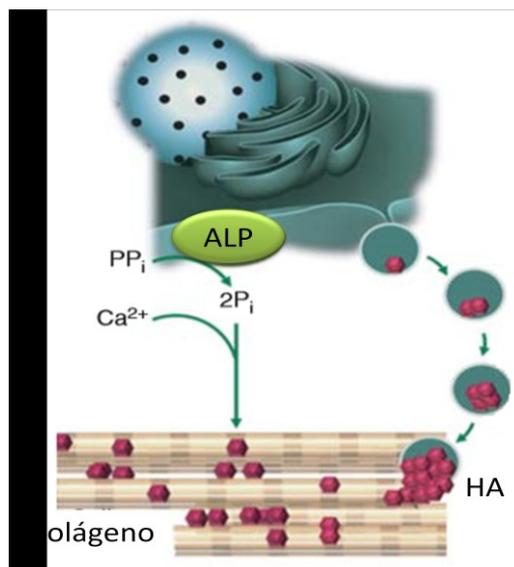
**Figura 5. Imagem ilustrativa da estruturação das fibras de colágeno.** Modificado de MOUW et al, 2014 (111).

No entanto, nem todas as moléculas de colágeno organizam-se para a formação de fibras, sendo apenas os tipos I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII envolvidos com a formação fibrilar. Dentre esses, o colágeno tipo I, que é formado por duas cadeias do tipo  $\alpha 1$  e uma cadeia do tipo  $\alpha 2$ , representa um grande volume proteico da composição dos tecidos corporais como pele, tendões e ossos (111, 116).

Nos ossos os espaços interfibrilares do colágeno, assim como aqueles existentes entre as extremidades COOH- e NH<sub>2</sub>- das triplas hélices são comumente reconhecidos como locais onde se depositam cristais minerais. Tais cristais são constituídos por íons Ca<sup>2+</sup> e P<sub>i</sub> que se organizam formando a estrutura cristalina da HA. No entanto, o mecanismo exato pelo qual ocorre a mineralização óssea ainda não é completamente conhecido. Tem-se proposto que as cadeias laterais de aminoácidos na estrutura da molécula de colágeno possam influenciar esse processo assim como as características nanométricas dos espaços existentes no interior das fibras, os quais impedem a deposição proteica, mas favorecem a deposição dos minerais (117, 118).

Além da estrutura das fibras de colágeno e da disponibilidade de Ca<sup>2+</sup> e P<sub>i</sub>, sabe-se que o processo de mineralização óssea é favorecido por osteoblastos por meio da produção da enzima ALP que age sobre substratos como o PP<sub>i</sub>, a partir do qual libera-se P<sub>i</sub> para mineralização. Além disso, um modelo baseado na teoria da vesícula extracelular explica que

tais vesículas liberadas por osteoblastos e condrócitos contém enzimas que atuam sobre fosfolipídios da membrana vesicular gerando fosfocolina que ao ser clivada pela enzima libera íons  $P_i$ , os quais favorecem a precipitação de  $Ca^{2+}$  e consequente formação dos cristais de HA (117) (**Figura 6**). Esses cristais além de conferirem rigidez e dureza aos ossos, juntamente com o colágeno proporcionam ao tecido a propriedade piezoelétrica (119), definida como a capacidade de transformar energia mecânica em potenciais elétricos (120), sendo que tal propriedade exerce importante influência na atividade das células ósseas (121).



**Figura 6.** Imagem ilustrativa da mineralização por meio de vesículas de matriz. Modificado de MURSHED, 2018 (117).

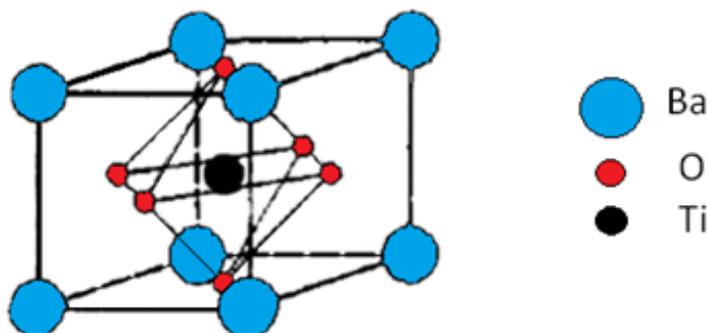
### 1.8 Nanopartículas de titanato de bário

A indução da atividade celular para a formação óssea tem sido realizada por meio da associação de colágeno com nanomateriais (122), os quais podem ser naturais ou sintéticos apresentando uma de suas dimensões com diâmetro normalmente menor do que 100nm (123). Vários nanomateriais tem sido utilizados na engenharia de tecidos para produção de *scaffolds* com a finalidade de favorecer a entrega de drogas (124) e genes (125) e responder à estímulos físicos como variação de temperatura (126) e campos magnéticos (127), assim como a exposição à tensões mecânicas (128) que podem gerar resposta piezoelétrica (129).

Nanomateriais piezoelétricos, como o titanato de bário ( $BaTiO_3$ ), apresentam o potencial de mimetizar o microambiente ósseo eletricamente ativo e promover maior atividade celular (130).

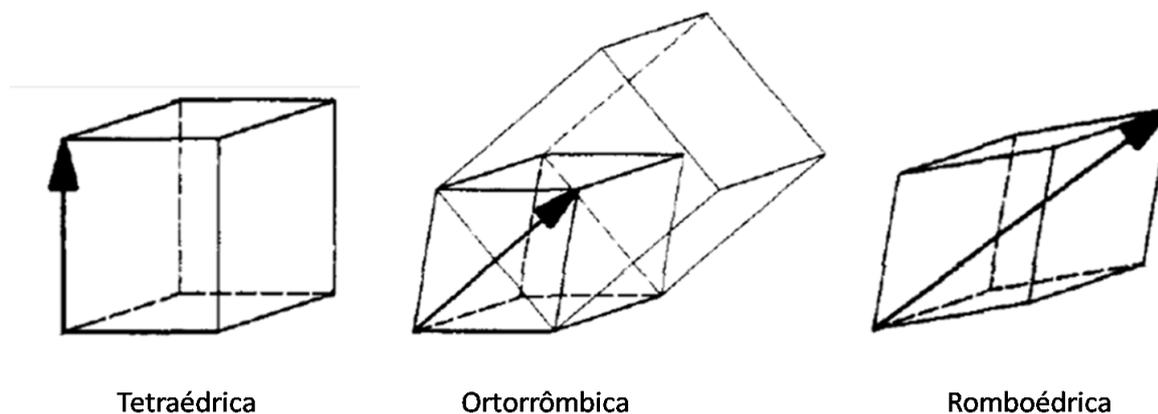
O  $\text{BaTiO}_3$  é um material cerâmico (131) cuja maior parte das aplicações encontra-se nos campos de eletro-óptica (132), eletromecânica (133), transdutores (134), e capacitores (135). A propriedade ferroelétrica do  $\text{BaTiO}_3$ , compreendida como a existência de polarização espontânea mesmo na ausência de campos elétricos externos, foi descoberta em 1945 por Wul e Goldman sendo o  $\text{BaTiO}_3$  um dos materiais ferroelétricos mais estudados (136, 137)

O  $\text{BaTiO}_3$  é formado por átomos de titânio, bário e oxigênio que se organizam para formar quatro fases cristalinas que variam de acordo com as condições de temperatura. Quando em temperaturas acima de  $120^\circ\text{C}$  o  $\text{BaTiO}_3$  apresenta-se em fase cúbica com estrutura cristalina chamada perovskita. Nessa configuração os átomos de bário encontram-se nos vértices do cubo abrigando átomos de oxigênio que formam uma estrutura octaédrica na qual um único átomo de titânio é identificado em seu interior (138). **Figura 7.**



**Figura 7. Imagem ilustrativa da fase cristalina cúbica simétrica.** Modificado de JIAG *et al.* 2018 (138).

Essa estrutura cúbica possui seus centros de cátions e ânions altamente simétricos o que resulta na ausência de polarização, sendo esta uma configuração em que não se identifica propriedades piezoelétricas. Quando em temperaturas abaixo de  $120^\circ\text{C}$  e acima de  $5^\circ\text{C}$  o centro de cátion desvia-se em direção a uma das faces do cubo resultando em uma estrutura tetraédrica não simétrica com polarização espontânea na qual se encontra a característica piezoelétrica do material. Propriedades ferroelétricas também podem ser identificadas na estrutura ortorrômbica, quando o material é resfriado para temperaturas entre  $5^\circ\text{C}$  e  $-90^\circ\text{C}$ , nas quais ocorre uma distorção em direção diagonal ao longo das faces. Abaixo de  $-90^\circ\text{C}$  tal distorção ocorre em direção diagonal em relação ao corpo do cubo caracterizando a estrutura romboédrica, cuja assimetria também gera características ferroelétricas (138). **Figura 8.**



**Figura 8.** Imagem ilustrativa das fases cristalinas assimétricas de titanato de bário. Modificado de JIAG *et al.* 2018 (138).

As nanopartículas de  $\text{BaTiO}_3$  (NPTB) apresentam boa biocompatibilidade *in vitro* (139) e já demonstraram promover melhora da osteogênese quando presente no meio de cultura em estudos com células tronco mesenquimais, o que foi identificado pela maior deposição de HA (140). *Scaffolds* com NPTB tem sido produzidos em associação com outros materiais como as biocerâmicas akermanite (141) e HA com o objetivo de favorecer a diferenciação e atividade celular (142).

Tendo em vista que tecidos biológicos apresentam campos elétricos, materiais como as NPTB tem potencial para promover a formação de um microambiente eletricamente ativo que pode favorecer a formação tecidual (143).

Considerando que diversas alterações ósseas como, por exemplo, a osteoporose e a osteonecrose da cabeça do fêmur, caracterizam-se pela dificuldade de formação, remodelamento e reparo ósseo, não existindo até o momento cura para estas afecções do sistema esquelético e que o uso de *scaffolds* na forma de biogel tem potencial para promover reparo ósseo de modo menos invasivo ao organismo, visto que o mesmo apresenta potencial para aplicação via injeção local, o presente projeto de mestrado visou estudar o potencial osteogênico do hidrogel de colágeno com NPTB como *scaffold* e analisar o efeito desse na maturação osteoblástica e reparo ósseo com a finalidade de promover recurso para favorecer o tratamento de lesões ósseas de difícil cicatrização.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir *scaffold* osteoindutor a base de colágeno e nanopartículas de titanato de bário e avaliar seu potencial osteoindutor.

### 2.3 Objetivos específicos

- Caracterizar as propriedades físicas, químicas e morfológicas das NPTB, bem como dos *scaffolds* de colágeno isolados e em associação com as NPTB.
- Analisar o efeito do colágeno xenogênico e alogênico na citocompatibilidade com osteoblastos de rato.
- Avaliar a osteocompatibilidade dos *scaffolds* a base de colágeno e NPTB em cultura primária de osteoblastos de rato.
- Avaliar a maturação de osteoblastos primários frente ao biogel de colágeno associado à NPTB.
- Analisar o potencial do biogel de colágeno com NPTB no reparo de lesão óssea em modelo de osteotomia de tíbia *in vivo*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cuidados éticos

Foram utilizados ratos Wistar machos com 12 semanas de vida. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo do Campus Dom Bosco da Universidade Federal de São João Del Rei (UFSJ) e permaneceram no Biotério de Animais Experimentais com ração padrão para ratos e água ad libitum, de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da instituição. O projeto com a metodologia utilizada nesse trabalho foi aprovado pelo CEUA com número de protocolo 009/2018 (Anexo).

#### 3.2 Nanopartículas de Titanato de bário (NPTB)

As NPTB (lote MKBF7837V, <100nm em fase cristalina cúbica, Sigma Aldrich®,USA) foram gentilmente cedidas pela professora colaboradora Michele Munk da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Para as análises físicas as NPTB foram dispersas em água ultrapura na concentração final de 0,1% (p/v) e em seguida colocadas em banho ultrassônico por 5 min. Para os ensaios biológicos foi utilizada a concentração estoque de 1% (p/v) das NPTB sendo dispersas em meio de cultura DMEM (Gibco®,USA) seguida de ultrassonicação por 5min. A partir da solução estoque concentrado realizou-se diluições para as diferentes análises. O preparo das NPTB foi realizado preferencialmente nos dias da utilização, sendo mantidas em temperatura ambiente.

##### 3.2.1 Microscopia de força atômica

Para realização de análises topográficas, as amostras de NPTB foram estudadas por meio de microscopia de força atômica (AFM). As nanopartículas dispersas em água ultrapura foram depositadas em substratos de mica clivada (1,0 x 1,0 cm) devidamente higienizados. Em seguida, as amostras foram secas com gás inerte (N<sub>2</sub>).

As medidas foram realizadas utilizando um microscópio de força atômica Park XE7 (Park Systems,USA) sob umidade e temperatura ambiente, no modo contato intermitente(CI), com uma sonda de silício com frequência natural de oscilação  $\omega_0=320\text{KHz}$  e constante elástica  $k=40\text{ N/m}$ .O software XEI foi utilizado para processamento e análises das imagens.

### 3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura e EDS

A análise morfológica das NPTB foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. Para tal análise nanopartículas dispersas em água ultrapura foram depositadas sobre um *stub* com a superfície revestida por uma folha de silício. Após secagem da água em temperatura ambiente a amostra foi analisada no microscópio FEG- quanta 200 FEI (FEI company,USA) do centro de microscopia da UFMG. No mesmo equipamento obteve-se a análise de espectrometria de energia dispersiva (EDS) para identificação qualitativa de elementos químicos presentes na amostra.

### 3.2.3 Espectroscopia Raman

A caracterização da composição das NPTB e colágeno também foram realizadas por meio de espectroscopia Raman. Para isso, 1ml de cada tipo de colágeno na concentração de 2mg/ml foram liofilizados e em seguida analisados.

Espectros Raman foram obtidos usando um FT-Raman Espectrômetro RFS / 100 (Bruker,USA) usando uma excitação Nd: YAG laser com  $\lambda = 1064$  nm. Os espectros foram registrados no intervalo espectral de 3500 a 50  $\text{cm}^{-1}$  em uma resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ . 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 com o programa Originpro8.

### 3.2.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial Zeta

O estudo do diâmetro das NPTBs também foi realizado por meio de análises de espalhamento dinâmico de luz (DLS), assim como a determinação do potencial Zeta que foram determinados em meio de cultura DMEM (pH 7,4). As análises foram realizadas por meio da técnica de microeletroforese Doppler a laser com o Zetasizer Nano ZN ( MalvernInstrumentsLtd, Malvern, Reino Unido). Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa Zetasizer software.

### 3.2.5 Microscopia de Força Elétrica

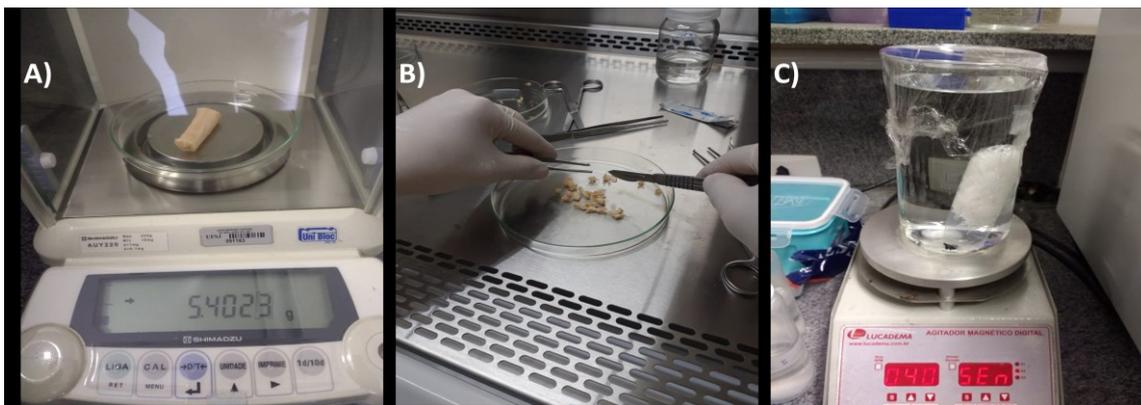
Para caracterizar as nanopartículas do ponto de vista das propriedades elétricas utilizou-se o sistema de medida de Microscopia de Força Elétrica (EFM – *Electric Force Microscopy*). Tal medida consistiu na utilização de uma sonda e uma alavanca condutoras além de um substrato condutor de óxido de silício sobre o qual a amostra foi depositada. Realizou-se a varredura da amostra no modo contato intermitente para geração de uma imagem de AFM e em seguida uma diferença de potencial foi aplicada sobre a amostra. A varredura foi então repetida medindo-se a interação elétrica entre a ponta da sonda e a amostra a partir de variações da frequência de oscilação da sonda. Para tais análises utilizou-se o Nanoscope V (Bruker Instruments, USA), Sonda NSC35/ AIBs da Micromaschfrequencia=148KHzModo: EFM.

### 3.3 Colágeno

O desenvolvimento dos biogéis foi realizado utilizando-se colágeno de rato e colágeno bovino a fim de estudar o efeito do colágeno alogênico e xenogênico e da sua associação com NPTB em sua biocompatibilidade em cultura primária de osteoblastos de rato.

#### 3.3.1 Extração de colágeno bovino

Para obtenção de colágeno bovino uma amostra de tendão obtida em matadouro local na cidade de São João Del Rei foi cortada em pequenos pedaços e tratada com acetona para remoção de material gorduroso. Posteriormente, 5 g de amostra foram lavados com água destilada e colocados em solução de NaCl 10% (m/V) durante 24h e mantidos à temperatura de 4°C. Após esse período, o material foi novamente lavado com água destilada e colocado em solução de tampão citrato 0,02mol/L pH 4,3 durante 48h em temperatura ambiente, para o intumescimento do tecido. O tecido intumescido foi homogeneizado em 500 mL de uma solução de ácido acético 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, na presença de pepsina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>,USA) na proporção de 1:50 (m:m) em relação a massa inicial do material. O gel formado foi mantido por 24h a 4°C. Após esse período, a proteína foi precipitada por *salting out* adicionando ao gel 5% de NaCl (m/V). O colágeno precipitado foi dialisado durante 72h contra água destilada (144). **Figura 9.**



**Figura 9. Extração de colágeno bovino.** As imagens mostram as etapas de: A) pesagem do tendão bovino, B) fragmentação e C) diálise por salting out. Imagens de arquivo próprio.

### 3.3.2 Extração de colágeno de rato

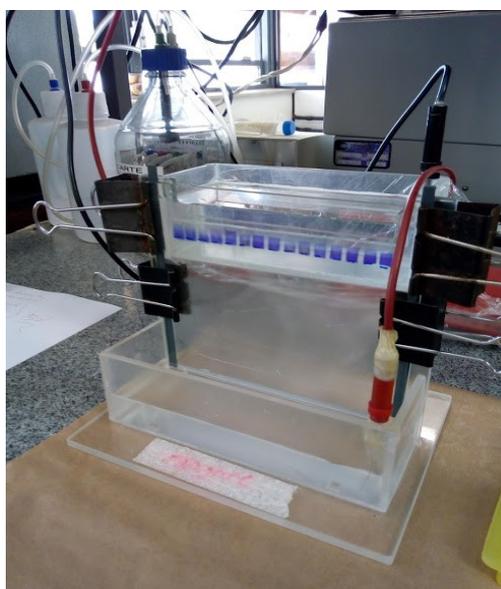
Para extração do colágeno de rato, utilizou-se 12-20 caudas de ratos Wistar saudáveis que foram cortados em suas bases e lavados com detergente e água destilada corrente. Em seguida o material foi colocado em recipiente com álcool 70% à 4°C pelo período de 24h. Para obtenção do tecido tendíneo rico em colágeno do tipo I o recipiente foi levado para dentro do fluxo laminar onde realizou-se torção das vértebras das caudas. Com auxílio de uma pinça dentada a extremidade de tecido conjuntivo exposto foi puxada e torcida para retirada das fibras de colágeno que foram cortadas e colocadas em um recipiente estéril contendo ácido acético 1% em água. O mesmo procedimento foi repetido ao longo de toda extensão da cauda e as fibras obtidas foram mantidas em ácido acético pelo período de 24-96h. Após esse período, a solução de colágeno foi ultracentrifugada à 30.000g por 2h e o sobrenadante foi então coletado e armazenado em geladeira à 4°C (145).

### 3.3.3 Concentração do colágeno

Para determinar a concentração das soluções de colágeno obtidas, realizou-se a pesagem de um microtubo vazio e novo. Em seguida foi adicionado 1ml da solução de colágeno dentro do microtubo que foi então congelado à -80°C e em seguida liofilizado. Realizou-se novamente a pesagem e a diferença nos valores entre a última e a primeira pesagem representou a concentração da solução em mg/ml.

### 3.3.4 Análise do colágeno por eletroforese

A fim de avaliar as semelhanças na composição das soluções de colágeno de rato e colágeno bovino, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração com a prata. Para tal experimento, preparou-se gel de separação de poliacrilamida em gradiente de concentração de 10-15%. Sobre esse foi depositado o gel de concentração (5%) onde 5 $\mu$ l de amostra de cada tipo de colágeno à 2mg/ml acrescidos de 5 $\mu$ l de tampão de amostra foram depositados nas canaletas. O padrão de peso molecular *Page Ruler™ broad range unstained protein ladder* (Thermo Fisher scientific®, USA) foi utilizado para identificação do peso molecular das bandas. **Figura 10.**



**Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida.** Gel de gradiente 10-15% (imagem de arquivo próprio).

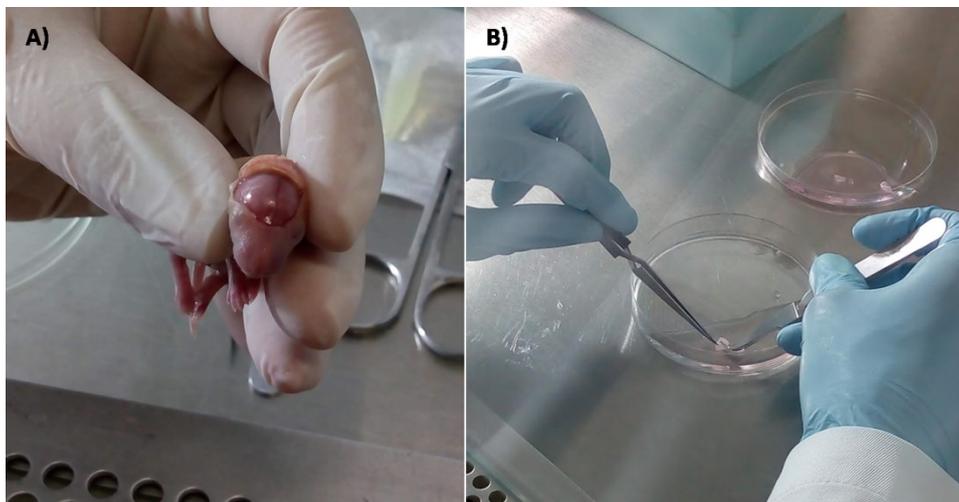
### 3.4 Osteoblastos

Tendo em vista a finalidade dos biogéis para aplicação em reparo ósseo, optou-se pela obtenção de cultura primária de osteoblastos para realização de experimentos biológicos *in vitro*. Tais experimentos tiveram por objetivo avaliar a biocompatibilidade das nanopartículas, bem como dos *scaffolds* à base de colágeno.

### 3.4.1 Isolamento de osteoblastos

Para o isolamento de osteoblastos primários foram utilizados para cada extração cerca de 10 a 12 animais provenientes do biotério do departamento de fisiologia da UFMG. Os ratos neonatos Wistar de até 5 dias de vida foram usados para coleta do osso da calvária como previamente descrito na literatura (56). Após eutanásia com dose letal de Ketamina e Xilasina conforme metodologia aprovada pela CEUA sob protocolo nº 009/2018 (anexo), foi realizada limpeza dos animais com iodopovidona após o qual eles foram levados para a cabine de fluxo laminar para decaptação. Foi realizado um escalpo do espécime com um corte partindo da rima ocular até o ouvido e unindo-se na parte frontal após o qual o retalho foi deslizado posteriormente expondo a calvária. Em seguida destacou-se a parte óssea com tesoura nas regiões das suturas mediana e parieto-occipitais. As amostras de calvárias foram recolhidas em tubo Falcon estéril contendo PBS (Gibco®,USA), 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco®,USA) e 0,05% de *fungizone* (Sigma Aldrich®,USA). Em seguida os fragmentos ósseos foram colocados em placa de petri para melhor fragmentação a fim de aumentar a área de contato dos mesmos e favorecer a digestão enzimática e extração celular.

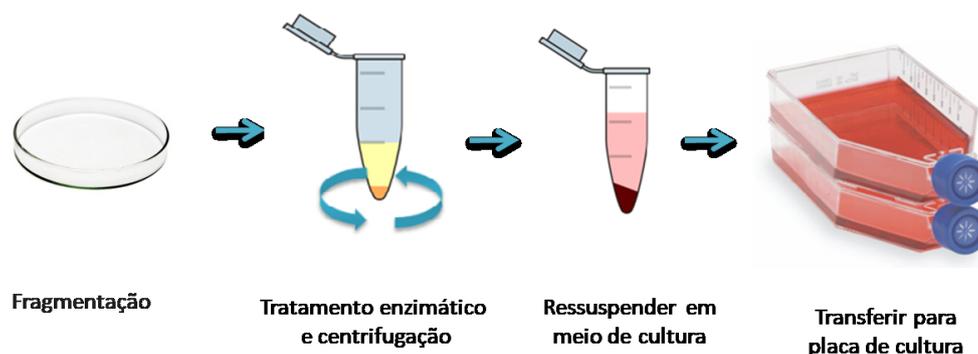
**Figura 11.**



**Figura 11. Obtenção de calvária de ratos Wistar neonatos.** A) imagem da calvária exposta, B) limpeza e fragmentação das calvárias em solução tampão. (Imagens de arquivo próprio).

Posteriormente os fragmentos foram sujeitos a um banho de tripsina na concentração 1x por 10 minutos seguido de quatro banhos sequenciais em colagenase 0,02% (Sigma Aldrich®,USA) em PBS mantidos em temperatura de 37°C, ( sendo que os sobrenadantes do

banho de tripsina e do primeiro banho de colagenase são descartados por conterem alta concentração de fibroblastos). Após cada banho de colagenase o sobrenadante foi centrifugado à 1400rpm por 5min e o pellet ressuscitado em meio de cultura DMEM suplementado (10% de soro fetal bovino, 1% de solução de penicilina e estreptomicina, 0,05% de *fungizone*) sendo as células transferidas para garrafas de cultura T25. Para os ensaios foram utilizadas células até a 5ª passagem. **Figura 12.**



**Figura 12. Modelo esquemático do processo de extração de osteoblastos.** Esquema ilustrativo das etapas para obtenção de cultura primária de osteoblastos a partir de calvárias de ratos Wistar neonatos. Os procedimentos são realizados dentro do fluxo laminar em condições estéreis.

### 3.4.2 Maturação Osteoblástica

Para avaliar a capacidade de produção de matriz óssea mineralizada pelos osteoblastos extraídos, realizou-se experimento de maturação osteoblástica pelo período de 14 dias. Utilizou-se dois grupos experimentais, no primeiro as células foram cultivadas em condições comuns (DMEM suplementado) e no segundo foram cultivadas em meio de cultura osteogênico composto por DMEM suplementado, acrescido de: 50µg/mL de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®,USA), 2mM de β-glicerofosfato (Sigma Aldrich®,USA) e 10nM de dexametasona (Sigma Aldrich®,USA), como previamente descrito na literatura (56). Em ambos os grupos o meio de cultura foi renovado a cada 2 a 3 dias.

O processo de maturação foi analisado pela produção de colágeno, atividade da enzima fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização após 14 dias de cultivo. Para tais experimentos foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células em placas de 24 poços que foram mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1 dia do plaqueamento foi realizada

substituição do meio de cultura normal para o meio de cultura osteogênico no grupo de indução osteogênica.

### **3.4.3 Avaliação da formação de nódulos de mineralização**

Para avaliar a formação dos nódulos de mineralização após 14 dias de cultivo, as células foram lavadas com PBS e em seguida fixadas com PFA (paraformaldeído) 4% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>,USA) gelado por 1h. Em seguida o fixador foi removido e as células foram novamente lavadas com PBS seguido por 2 lavagens com água destilada estéril e coradas por 30min com 500µL da Solução de *Alizarin Red S*. (Sigma Aldrich<sup>®</sup>,USA). O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas e a coloração dos depósitos de cálcio foi registrada por meio de microscopia óptica em aumento de 4x. Imagens dos poços contendo as lâminas coradas também foram capturadas por meio de fotografia digital. (146)

### **3.4.4 Avaliação da atividade de fosfatase alcalina.**

A enzima ALP catalisa a hidrólise de ésteres de fosfato dentro de um ambiente alcalino, tendo por resultado a formação de um radical orgânico e fosfato inorgânico. A ALP é uma enzima chave no processo de mineralização óssea e em osteoblastos maduros ela é produzida intensamente. A análise da atividade de ALP consistiu da exposição dos osteoblastos aos substratos NBT-BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium Chloride / bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt*) após 14 dias de cultivo. Para tal, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com PBS.Em seguida adicionou-se 200µl da solução de NBT-BCIP (Invitrogen<sup>®</sup>,USA) após o qual as células foram incubadas pelo período de 2h. Ao término desse período observou-se a formação de áreas azul-púrpura nas células como resultado da ação da enzima ALP sobre o substrato adicionado. Imagens da marcação foram capturadas por meio de fotografias digitais e por microscopia óptica em aumento de 4x.

Após captura das imagens adicionou-se 200µl de sódio dodecil sulfato (SDS) -10% HCl para solubilizar os cristais formados e realizar a quantificação espectrofotométrica em leitor de placa Varioskan Flash (Thermofisher scientific<sup>®</sup>,USA). A placa foi mantida em incubadora *overnight* à 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. Em seguida 100µl de cada poço foram transferidos para placa de 96 poços para leitura por absorvância em comprimento de onda de 595nm (147, 148).

### 3.4.5 Quantificação de colágeno produzido por osteoblastos

A produção de colágeno foi avaliada por meio da coloração com *Sirius red* 0,1% (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, USA) em ácido pícrico 1,3% (149). Para tal as células foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4% gelado por 1h ao término de 14 dias experimentais. Em seguida o fixador foi removido e as células foram novamente lavadas com PBS. O tampão foi removido e 300µl do corante *Sirius Red* foi adicionado aos poços. Após 1h de coloração, o corante foi removido e os poços foram lavados com água acidificada (0,5% HCl). Fotografia digital e imagens de microscopia óptica em aumento de 4X foram capturas para análise da formação de colágeno.

Também foi realizada a quantificação de colágeno solúvel utilizando-se o kit *Sircol*<sup>™</sup> *Soluble Collagen Assay* (Biocolor<sup>®</sup>, Reino Unido). Foram aliqüotados 25µl do meio de cultura de cada poço para microtubos aos quais foram acrescentados 250µl de *DyeReagent*. Os microtubos foram mantidos em agitação por 30min e em seguida foram centrifugados à 12000rpm durante 10min em temperatura de 25 °C. Após centrifugação os sobrenadantes foram descartados e aos *pellets* acrescentou-se 300µl da solução de *Acid Salt Wash* gelado. Os microtubos foram novamente centrifugados com os mesmos parâmetros e os sobrenadantes descartados. Em seguida foram adicionados 125µl de *AlkaliReagent* e os microtubos foram agitados para homogeneização do *pellet* com o sobrenadante. Posteriormente 100µl de cada amostra foram transferidos para placa de 96 poços para leitura espectrofotométrica por absorbância em 555 nm no leitor de placas varioskán Flash.

### 3.4.6 Expressão gênica

Para a análise da expressão de genes envolvidos com o processo de maturação osteoblástica,  $2 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de 6 poços nas quais as células foram cultivadas em condições osteogênica e não osteogênica durante o período de 14 dias.

#### 3.4.6.1 Extração de RNA total

O RNA total das células nos dias 3, 7 e 14 foi extraído utilizando o método de homogeneização com TRIzol (Life Technologies<sup>®</sup>, USA) na proporção de 1 mL de TRIzol por amostra. Após extração, o RNA foi dissolvido em água livre de RNase, sendo a concentração e a pureza determinada pela absorbância a 260 nm (A260) e pela razão das

absorbâncias A 260/A 280, respectivamente. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1%. O RNA foi aliquotado e estocado a - 80 °C, até seu uso.

### 3.4.6.2 Transcrição reversa e PCR em tempo real

A análise da expressão do RNAm foi feita a partir da amplificação de uma região específica dos genes. Para isso, o DNA complementar (DNAc) foi obtido através da reação de transcrição reversa, utilizando-se o *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermofisher scientific<sup>®</sup>, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Para evitar a possibilidade de contaminação das amostras por DNA genômico, todas foram previamente tratadas com DNase.

Após a obtenção do DNAc, oligonucleotídeos (primers) que se localizam em diferentes éxons dos genes de interesse foram utilizados para a análise da expressão gênica na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para o controle da reação, foram utilizados também oligonucleotídeos específicos para o gene *Gapdh*. O sistema TaqMan de PCR em tempo real foi utilizado para a quantificação da expressão gênica. As reações foram conduzidas com os seguintes genes: *Runx2*, *Colla1*, *Bglap* (osteocalcina), *Bmp2*, *Alpl* e *Gapdh*, cujas sequências dos *primers* utilizados estão descritas na **tabela 1**.

**Tabela 1 - Sequências dos primers usadas para análise de expressão gênica por qRT-PCR.**

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
<b>Colla1</b>	5'-GTCCGAGGTCCTAATGGAGATGC-3'	5'-GGTCCAGGGAATCCGATGT-3'
<b>Runx2</b>	5'- CCACAGAGCTATTAAGTGACAGTG 3'	5'-AACAAACTAGGTTTAGAGTCATCAAGC-3'
<b>Bglap</b>	5'-CTTGGTGCACACCTAGCAGA-3'	5'-ACCTTATTGCCCTCCTGCTT-3'
<b>Gapdh</b>	5'-TGATTCTACCCACGGCAAGTT-3'	5'-TGATGGGTTTCCCATTTGATGA-3'
<b>Alpl</b>	5'-GCACAACATCAAGGACATCG-3'	5'-TCAGTTCTGTTCTTGGGGTACAT-3'
<b>Bmp2</b>	5'-GACATCCACTCCACAAACGAGA-3'	5'-GTCATTCCACCCACATCACT-3'

Os primers utilizados foram desenhados para as regiões codificantes dos genes utilizando os programas *Primer-BLAST* e *oligoanalyzer*, considerando 60°C como temperatura de anelamento e a especificidade para o gene com as menores probabilidades de formação de homodímeros e heterodímeros (150, 151).

### 3.5 Citotoxicidade das nanopartículas

Para avaliar a biocompatibilidade das nanopartículas e definir a concentração de uso para a produção dos *scaffolds*, foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços utilizando 100µl de meio de cultura DMEM suplementado em cada poço. Após 24 h do plaqueamento o meio de cultura foi substituído e as células foram expostas às seguintes concentrações de NPTB: 1µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml, 100µg/ml, 250µg/ml, 500µg/ml, 750µg/ml, 1000µg/ml, 1250µg/ml, 1500µg/ml. Após 72h de incubação com as NPTB o meio de cultura foi substituído por 100µl de DMEM suplementado acrescido de 10µl de *AlamarBlue™ CellViabilityReagent* (Invitrogen®, USA).

Em seguida as células foram incubadas pelo período de 3,5 hs ao abrigo de luz à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término desse período 100µl do sobrenadante de cada poço foi transferido para placa de leitura, a qual foi analisada espectrofotometricamente em absorbância de 570nm (e em 600nm como valor de referência para normalização). Os valores obtidos foram expressos como % de redução do *Alamar Blue* (152).

### 3.6 Preparo dos *scaffolds* de colágeno

Para produção de 1ml de biogel de colágeno, foram utilizados 690µl de solução estoque de colágeno à 2,9 mg/ml, acrescido de 100µl de NaOH 3M, e 210µl de meio de cultura DMEM sendo a concentração final do colágeno nessa solução de 2mg/ml (153, 154). Após homogeneização, 300µl da solução do biogel foram depositados por poço em placa de 24 poços e incubados à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h do plaqueamento 300µl de DMEM foi adicionado sobre os *scaffolds* para manter a hidratação.

Procedimento semelhante foi utilizado para produção dos grupos de *scaffolds* com NPTB. Nesses grupos foram adicionados 100µl de meio de cultura contendo NPTB cuja concentração final para 1ml de biogel fosse a determinada pelo teste de viabilidade do item

3.5. Tal volume foi empregado em substituição de 100µl de DMEM puro utilizados nos *scaffolds* sem NPTB.

### 3.7 Análise dos *scaffolds* por MEV

Para realizar análises da superfície dos *scaffolds* por meio de MEV procedeu-se com a fixação desses com 0,5% de glutaraldeído (Sigma Aldrich<sup>®</sup>,USA) em PFA 4% preparado em PBS pH7,4. As amostras ficaram imersas nesta solução por 15min a 4°C. Em seguida, as amostras foram lavadas 1X com PBS pH7,4 e mantidas nesse mesmo tampão à 4°C até o preparo subsequente. As demais etapas do preparo foram realizadas por técnicos do centro de microscopia da UFMG. Tais etapas compreendem a fixação secundária com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>,USA), desidratação, secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>, montagem em *stub* metalização com camada de 3nm de partículas de ouro. Em seguida procedeu-se com a captura das imagens no microscópio eletrônico de varredura FEG- quanta 200 FEI do mesmo centro de microscopia.

### 3.8 Biocompatibilidade dos *scaffolds*

Para avaliar a biocompatibilidade dos *scaffolds* realizou-se teste de viabilidade celular com *Alamar Blue*, associado à marcação com *LIVE/DEAD<sup>TM</sup> viability/cytotoxicity Kit for mammalian cells* (Thermofisher scientific<sup>®</sup>,USA) e análises de morfologia celular por meio de MEV.

#### 3.8.1 Viabilidade celular com *Alamar Blue*.

Para avaliar a viabilidade celular frente aos diferentes *scaffolds*,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas em triplicatas utilizando 100µl de meio de cultura DMEM suplementado por poço para cada um dos grupos. O experimento foi executado em placas de 96 poços preparadas com 50µl de biogel por poço. Após o período de 72h o meio de cultura foi substituído por 100µl de DMEM suplementado acrescido de 10µl do reagente *Alamar Blue*. Os demais passos foram executados como descrito no item 3.5.

#### 3.8.2 Viabilidade celular com *LIFE/DEAD*

A viabilidade celular sobre os *scaffolds* também foi analisada por meio da marcação com *LIFE/DEAD*. Para isso,  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas sobre 20µl de biogel e após 72h

tratadas com 30µl de solução contendo 4µM de homodímero-1 de etídio (EthD-1) para marcação vermelha de células inviáveis e 2µM de calceína para marcação verde de células viáveis. Após 10-15min as células foram analisadas e as imagens capturadas em microscópio de fluorescência invertido (155, 156).

### **3.8.3 Morfologia celular por MEV**

Para realização da MEV, 300µl de cada biogel foram depositados em placa de 24 poços nas quais  $1 \times 10^4$  células foram plaqueadas. Pós 72h de cultivos o meio de cultura foi removido e as células aderidas aos *scaffolds* foram fixadas e preparadas conforme o protocolo descrito no item 3.7.

## **3.9 Maturação osteoblástica nos *scaffolds***

Para estudar a maturação celular nos *scaffolds*, optou-se por escolher o grupo cujo tipo de colágeno apresentou tendência a uma maior viabilidade celular. Assim realizou-se análises da atividade de fosfatase alcalina após 14 dias de cultivo e do perfil de expressão gênica em 7 e 14 dias.

### **3.9.1 Fosfatase alcalina**

Para avaliação da atividade de ALP foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células em placas de 96 poços preparadas com os distintos biogéis e utilizando-se DMEM suplementado sendo que esse foi substituído a cada 2 a 3 dias. Ao término de 14 dias de cultivo o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com 100µl da solução de NBT-BCIP por 2h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término desse período a solução foi substituída por PBS e em seguida realizou-se captura de imagem com a lupa Nikon SMZ745T(Nikon®, Japão).

Após captura das imagens as células foram incubadas com 100µl de SDS 10% HCl *overnight*. Posteriormente os 100µl foram transferidos para placa de leitura para análise espectrofotométrica em comprimento de onda de 595nm.

### 3.9.2 Expressão gênica.

Para analisar o perfil de expressão gênica, triplicatas de 1ml de biogel foram depositadas em placas de 6 poços nas quais plaqueou-se  $1 \times 10^5$  células por poço utilizando-se 2ml de DMEM suplementado por poço.

Após 7 e 14 dias de cultivo as células foram removidas dos poços utilizando-se uma solução contendo 0,25% de Tripsina (Gibco®,USA) e 0,1% de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Sigma Aldrich®,USA) por 20 a 37°C, seguido de centrifugação a 500g por 5min. As demais etapas do processo, que compreendem a extração de RNA, conversão em DNAc e RT qPCR seguiram os mesmos parâmetros descritos no item 3.4.6.

### 3.10 Experimentação *in vivo*

Com a finalidade de estudar o potencial do biogel de colágeno de rato com NPTB em promover reparo tecidual, utilizou-se 48 ratos wistar machos de 12 semanas de idade. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: controle, colágeno e colágeno + NPTB. Cada grupo foi composto por 16 animais, sendo metade para análises em 7 dias e a outra metade para 14 dias.

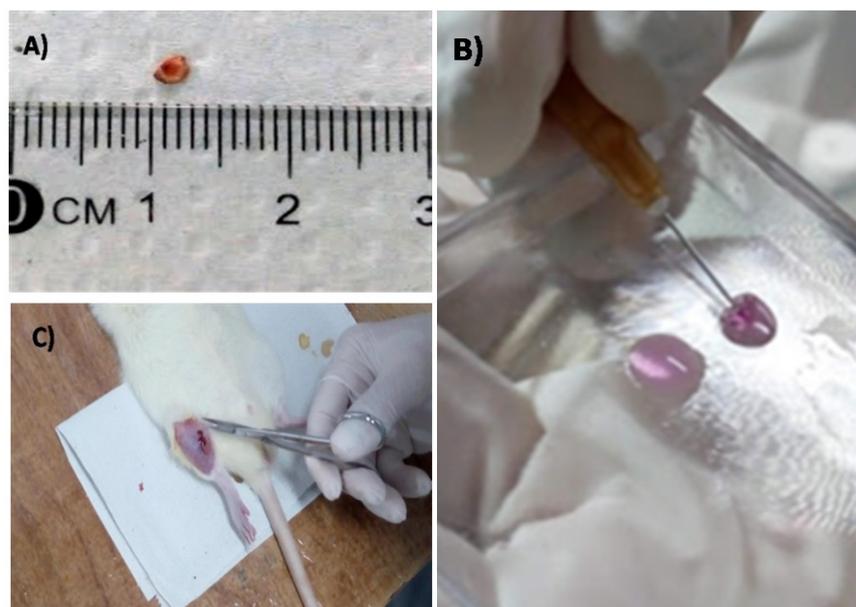
O reparo tecidual ósseo foi estudado utilizando-se modelo de osteotomia de tíbia. Para tal, 0,15ml de xilasina + 0,3ml de quetamina foram administrados intraperitonealmente. Após sedação os animais foram submetidos ao procedimento de tricotomia na região anteromedial da tíbia direita.

Os animais foram então pesados e em seguida tiveram a pele higienizada com iodopovidona. Uma incisão na região anteromedial da tíbia foi realizada seguida do afastamento da pele e tecido muscular (**Figura 13**). Em seguida procedeu-se com o procedimento de osteotomia que consistiu na utilização de uma broca trefina de 0,22mm posicionada na região anteromedial do terço superior da tíbia, tomando-se como referência a tuberosidade da tíbia. Durante o procedimento a região foi hidratada com soro fisiológico para evitar aquecimento.



**Figura 13.**Preparo para osteotomia. Em A) anestesia intraperitoneal, B) incisura e C) afastamento da pele e tecido muscular. Imagens de arquivo próprio.

Os animais dos grupos colágeno e colágeno + NPTB receberam 40 $\mu$ l do biogel que foi previamente preparado na forma de gotas de colágeno. As gotas foram colocadas em superfície plástica estéril e mantidas em temperatura ambiente dentro do fluxo laminar por 30-40 minutos enquanto o preparo dos animais era realizado. Uma gota de colágeno foi então introduzida dentro da área da lesão de cada animal com o auxílio de uma agulha. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento com biogel, tendo sido apenas hidratado com soro fisiológico. Os animais foram em seguida suturados e tratados com antibiótico enoxifloxacina 20mg/ml. As mamadeiras de água também foram preparadas com antibiótico na concentração final de 0,1mg/ml durante 3 dias após lesão. Uma gota de dipirona mono-hidratada 23,8mg foi administrada em cada animal após a cirurgia e durante 3 dias a cada 24 h após o procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos foram realizados com auxílio de um médico veterinário experiente. **Figura 14.**



**Figura 14. Etapas da experimentação in vivo.** Em A) fragmento ósseo de 2mm removido da tíbia com broca trefina, B) Biogel de colágeno sobre superfície plástica e C) Procedimento de sutura na área da incisão. Imagens de arquivo próprio.

Após 7 e 14 dias do procedimento de osteotomia, os animais foram eutanasiados utilizando-se isoflurano. Os ossos foram então coletados, lavados em soro fisiológico e em seguida fixados com formol 10% por 24h. As amostras foram em seguida descalcificadas durante 40 dias utilizando EDTA 10%. Após descalcificação as amostras foram incluídas em blocos de parafina e cortadas em micrótomo em espessura de  $0,5\mu\text{m}$ . Em seguida realizou-se a coloração com hematoxilina e eosina para captura de imagem em microscópio óptico e posterior análise do reparo das lesões.

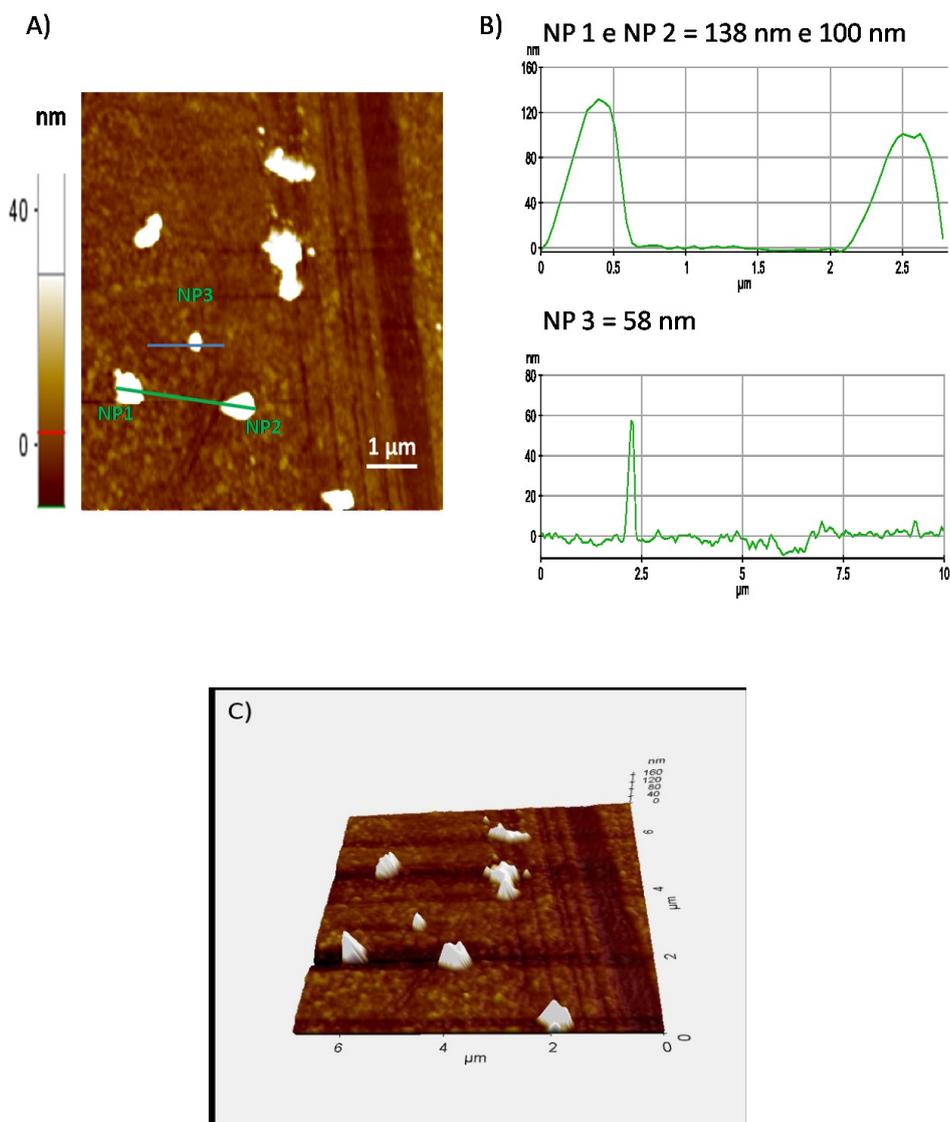
### 3.11 Análise estatística

Os dados dos ensaios biológicos foram expressos como média  $\pm$  EPM de  $n$  experimentos. As diferenças entre os grupos nos experimentos foram analisadas por teste *t-student* e análise de variância (ANOVA), seguido por teste de Bonferroni. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das Nanopartículas de Titanato de Bário

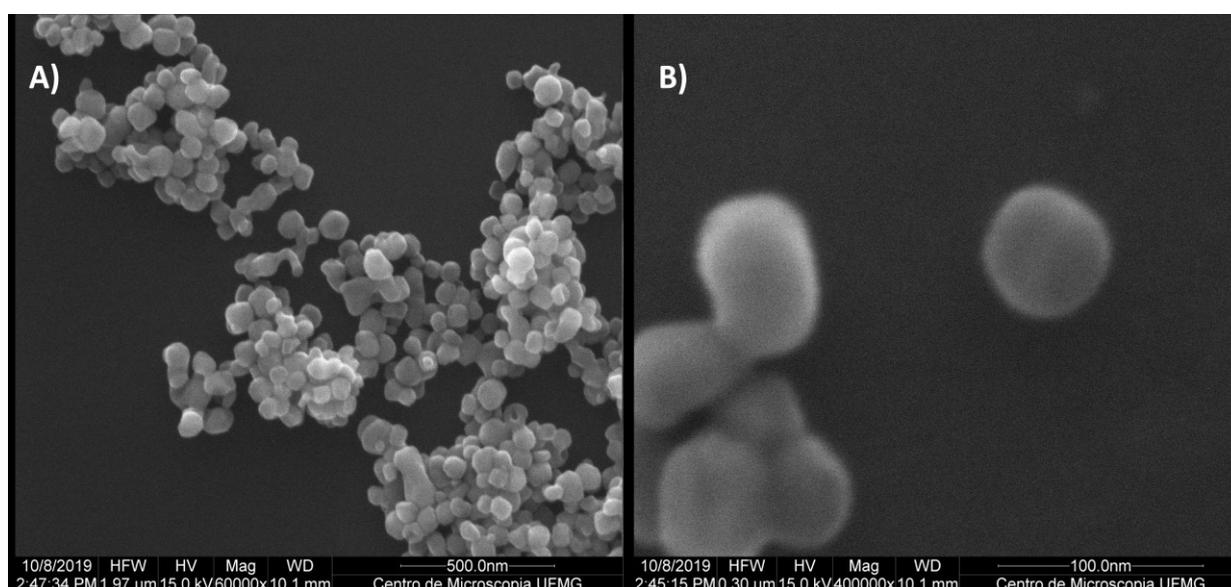
As NPTB foram analisadas topograficamente por meio de AFM. Após terem sido depositadas sobre uma superfície de mica, a varredura permitiu identificar estruturas com diferentes perfis topográficos como mostrado na figura 15. A e C, sendo o menor deles medindo aproximadamente 58nm de altura (**Figura. 15. B**). As demais estruturas analisadas apresentaram valores variados de 138nm e 100nm. **Figura 15.**



**Figura 15. Análise topográfica das Nanopartículas de Titanato de Bário por AFM.**A) Imagem de AFM da deposição de Nanopartículas de Titanato de Bário(NPTB), sendo realizado medida das nanopartículas (NP) em NP1, NP2 e NP3 B) Gráficos demonstrando medidas das NP1, NP2 e NP3 C) Imagem tridimensional da região em análise.

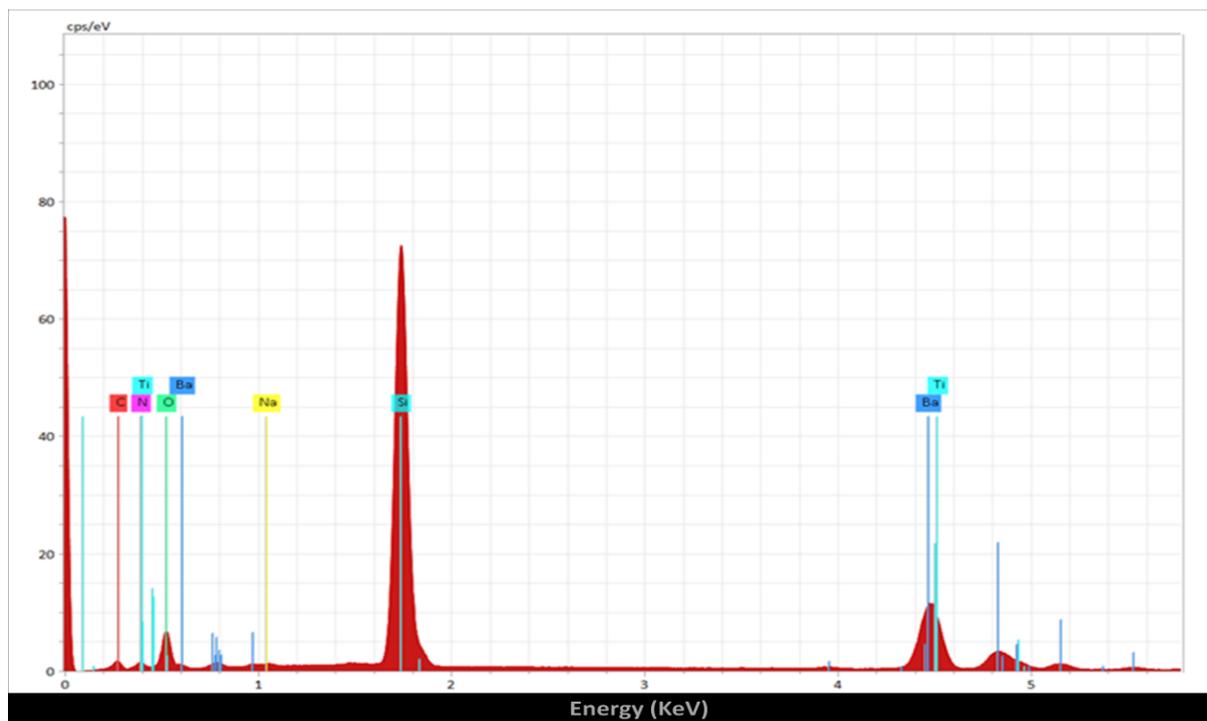
No entanto, as estruturas que apresentam maiores valores de diâmetro podem corresponder à aglomerados de nanopartículas, enquanto as menores estruturas compreendem as nanopartículas isoladas. Para confirmar se houve aglomeração e o tamanho das NPTB isoladas realizou-se MEV das amostras.

Observou-se por MEV a presença de aglomerados de nanopartículas (**Figura. 16. A**), assim como nanopartículas isoladas que possuem cerca de 60nm de diâmetro, apresentando morfologia esférica com tendência à um aspecto cúbico (**Figura. 16. B**). Tais resultados demonstram semelhança às análises realizadas por AFM, além de confirmarem a presença de aglomerados de NPTB.



**Figura 16. Análise topográfica das Nanopartículas de Titanato de Bário porMEV.** Observa-se em A) aglomerados de nanopartículas e em B) um aglomerado de nanopartículas e uma nanopartícula isolada.

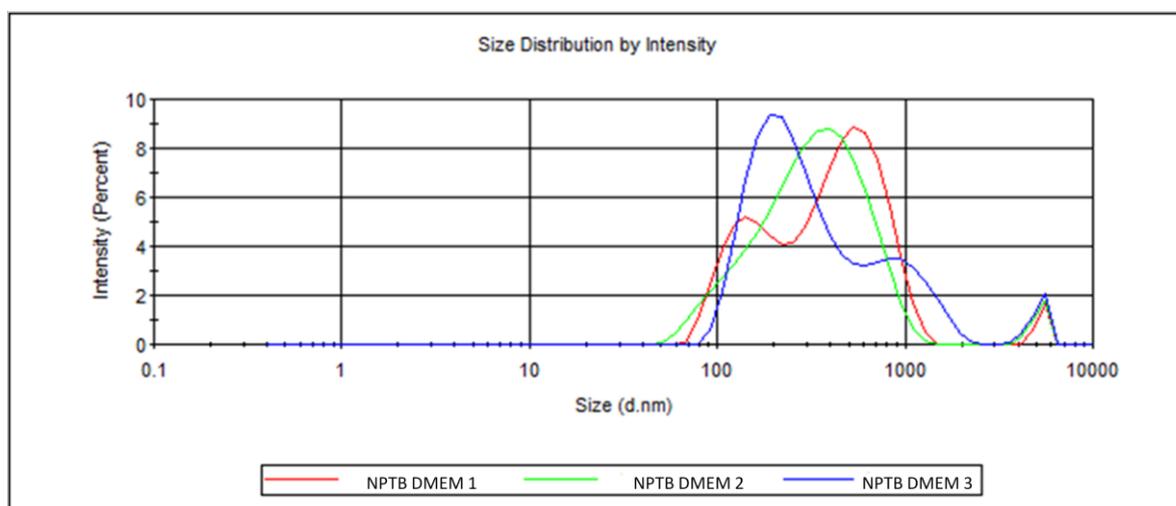
Após captura das imagens realizou-se a identificação qualitativa dos elementos químicos presentes na amostra por meio de EDS. Identificou-se a presença de bário, oxigênio e titânio, como esperado para as nanopartículas em questão. No entanto, os elementos carbono, sódio e silício também foram identificados, sendo que a presença do silício está relacionada com o substrato em que as nanopartículas foram depositadas. **Figura 17.**



**Figura 17.** Gráfico representando análise qualitativa da composição química das NPTB por EDS.

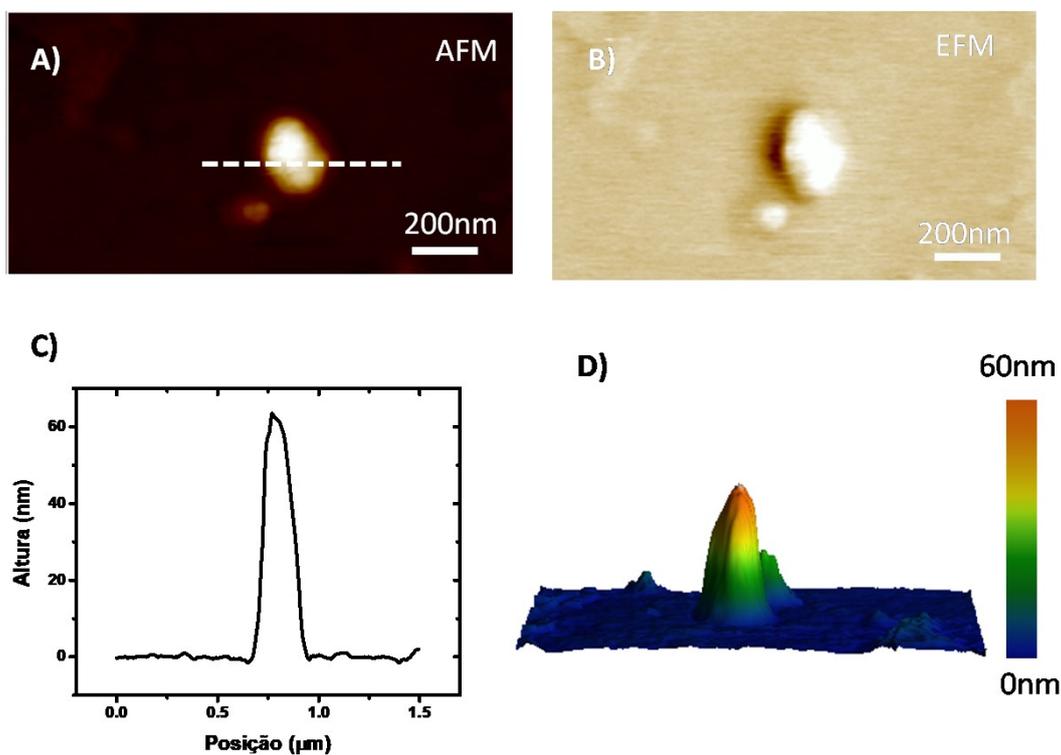
Para verificar a dispersão em solução das NPTB, estas foram analisadas por meio de DLS após serem dispersas em meio de cultura DMEM sem suplementação utilizado no cultivo celular dos osteoblastos. As NPTB apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 287,3nm, sugerindo a formação de agregados de nanopartículas, corroborando com as análises de AFM e MEV, para as quais foi obtido potencial Zeta com valor médio de -11,17mv.

**Figura 18.**



**Figura 18.** Gráfico representativo da distribuição de tamanho obtida por análise DLS.

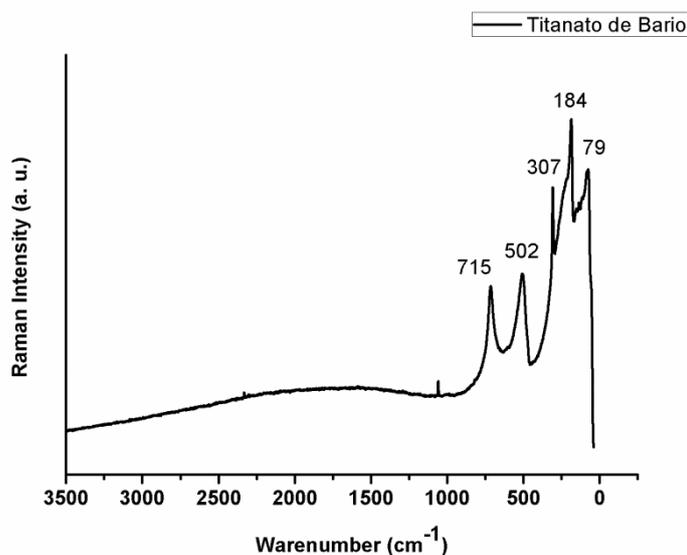
Além da carga de superfície, buscou-se identificar propriedades elétricas das NPTB por meio da análise do perfil condutor utilizando EFM (**Figura 19**). A partir de tal análise observou-se que as nanopartículas de 60nm de altura (**Figura 19A**) apresentam um baixo perfil condutor, o qual pode ser identificado na imagem de EFM nas áreas mais claras localizadas na superfície das NPTB em relação às áreas mais escuras do substrato onde as NPTB foram depositadas (**Figura 19 B**). Tal comportamento está de acordo com o perfil esperado para as NPTB tendo em vista que a baixa condutividade é uma característica típica de materiais piezoelétricos.



**Figura19. Análise topográfica e perfil condutor das Nanopartículas de Titanato de Bário por AFM e EFM de uma nanopartícula.** Observa-se em A) imagem de AFM de uma NPTB, em B) análise por EFM da mesma nanopartícula, C ) representação gráfica da medida da nanopartícula analisada e em D) imagem tridimensional de A e C.

Considerando que a piezoelectricidade das NPTB é dependente da organização dos seus átomos em uma estrutura cristalina tetraédrica, realizou-se a caracterização de tal estrutura por meio de espectroscopia Raman. O espectro Raman obtido permitiu a identificação de picos nas regiões de  $715\text{cm}^{-1}$ ,  $502\text{cm}^{-1}$ ,  $307\text{cm}^{-1}$  e  $184\text{cm}^{-1}$  os quais foram atribuídos à modos vibracionais característicos da fase tetraédrica. Além dos picos citados, também identificou-se um pico na região de  $79\text{cm}^{-1}$ , o qual foi relacionado às vibrações provenientes dos átomos de

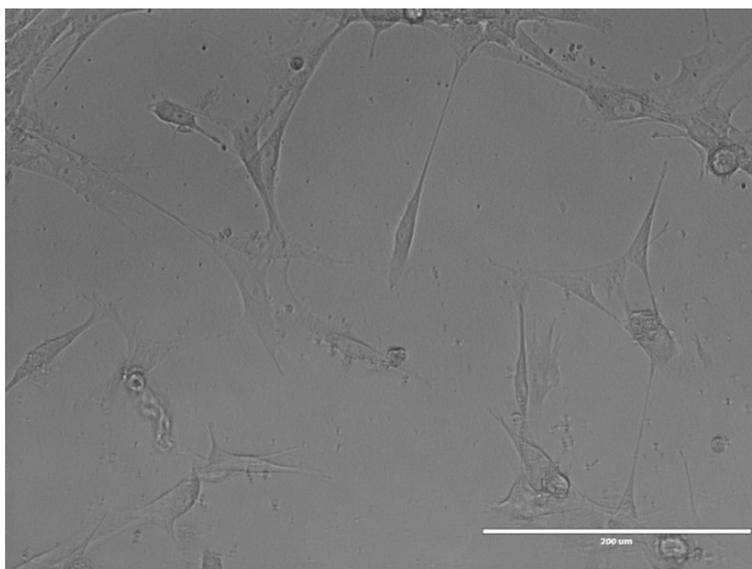
bário. Sendo assim, as amostras de NPTB apresentam composição e característica estrutural típica de NPTB piezoelétricas. **Figura 20.**



**Figura 20. Espectro Raman das NPTB.** Faixa espectral entre 0 a 3500 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.2 Estudo *in vitro*

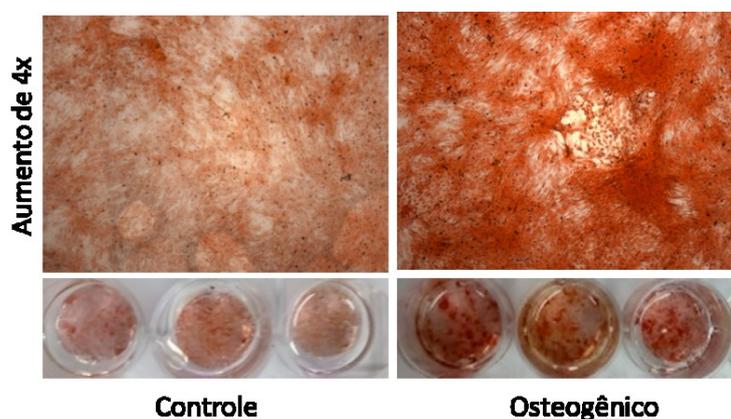
Os osteoblastos extraídos a partir das calvárias por meio da metodologia descrita no item 3.4.1 apresentaram capacidade de adesão à superfície plástica das garrafas de cultura onde pôde-se identificar células com prolongamentos e morfologia variando entre o aspecto fusiforme e estrelado como observa-se na **figura 21.**



**Figura 21. Imagem de osteoblastos isolados da calvária de ratos Wistar neonatos cultivados em meio de cultura DMEM suplementado.** Aumento de 20x em microscópio óptico digital invertido EVOS.

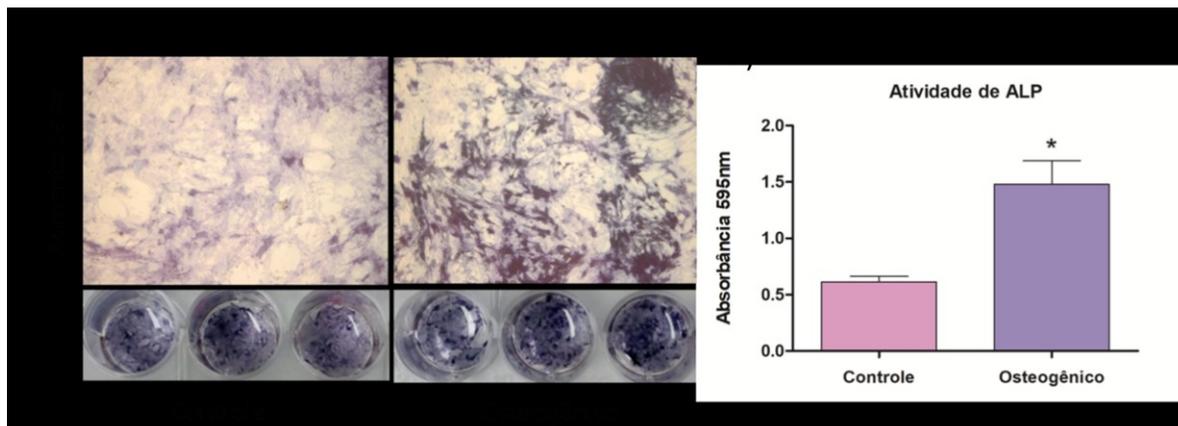
#### 4.2.1 Caracterização da Cultura primária de osteoblastos

Em seguida, para avaliar a extração celular realizou-se ensaio de capacidade de mineralização, produção e atividade de ALP e colágeno. A fim de analisar a capacidade dos osteoblastos extraídos em atuar na produção de MEC mineralizada,  $1 \times 10^4$  células foram cultivados em condições osteogênicas e não osteogênicas. Ao término do 14º dia de cultivo observou-se que os poços onde as células foram cultivadas na presença de fatores osteogênicos apresentaram maior marcação pelo corante *Alizarin Red*, representando uma maior formação de nódulos de mineralização (**Figura 22**). Tais resultados demonstram que as células extraídas apresentam capacidade de mineralização caracterizando-as como células do nicho ósseo, sendo os osteoblastos.



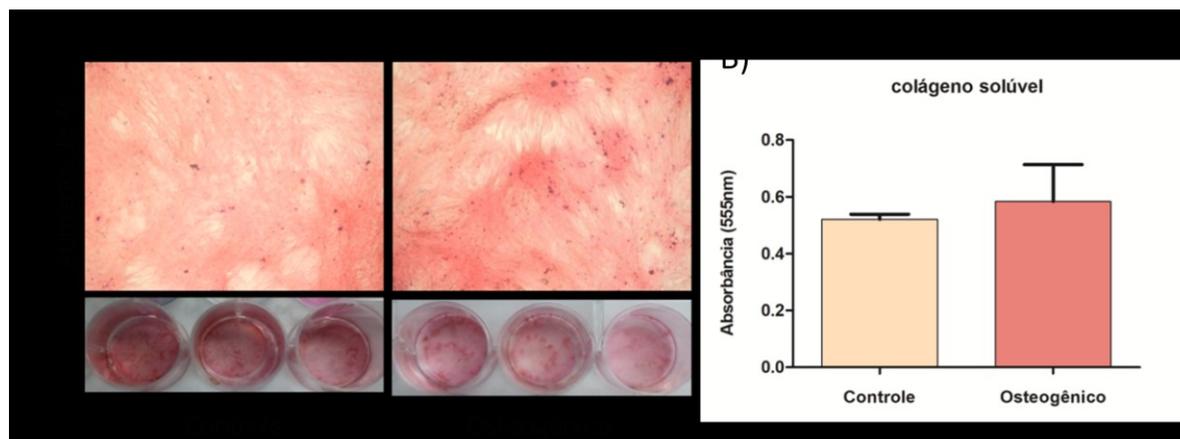
**Figura 22.** Imagem representativa de coloração por Alizarin Red para identificação de mineralização após 14 dias de cultivo. A imagem da esquerda representa células cultivadas em meio controle não osteogênico e nas imagens da direita as células foram cultivadas em meio com fatores osteogênicos. As imagens inferiores representam os poços de cultura após coloração. Imagens superiores foram retiradas em aumento de 4x em microscópio óptico invertido.

Para avaliar a atividade de ALP produzida pelas células, as mesmas foram expostas aos substratos NBT-BCIP sobre os quais a ação da enzima gera marcação azul-púrpura típica da reação. No grupo osteogênico observou-se maior marcação em comparação ao grupo controle (**Figura. 23A**), o que foi confirmado por análise quantitativa realizada por meio da solubilização da marcação seguida por leitura espectrofotométrica (**Figura. 23B**).



**Figura 23. Atividade enzimática de fosfatase alcalina em osteoblastos após 14 dias de cultivo.** A) A imagem da esquerda representa células cultivadas em meio controle não osteogênico e nas imagens da direita as células foram cultivadas em meio com fatores osteogênicos. As imagens inferiores representam os poços de cultura após ação enzimática de fosfatase alcalina (ALP). Imagens superiores foram retiradas em aumento de 4x em microscópio óptico invertido. B) Gráfico representativo da análise quantitativa espectrofotométrica em absorbância de 595nm da atividade enzimática de ALP. Observa-se aumento significativo na presença de meio osteogênico. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p < 0,05$ )

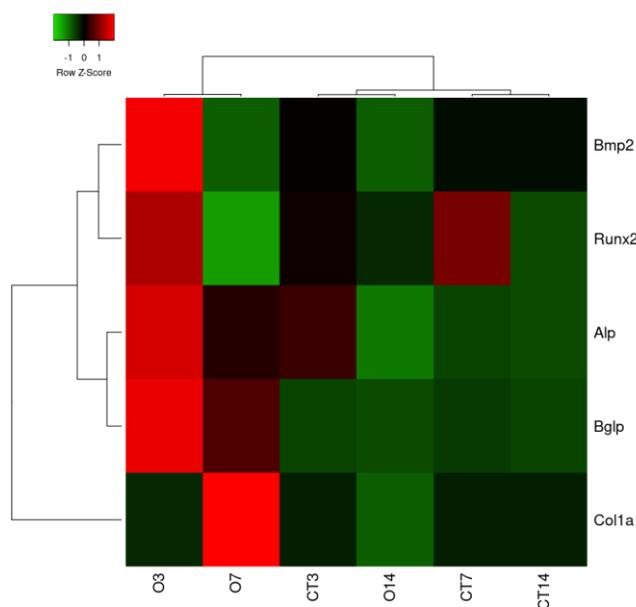
Tendo em vista que os osteoblastos são responsáveis pela produção de grande quantidade de colágeno para formação da MEC óssea, realizou-se análise da produção de colágeno por meio da coloração com *Sirius Red*. Tal coloração permitiu observar que ao término de 14 dias de cultivo não houve grande diferença entre os grupos osteogênico e controle. A quantificação de colágeno solúvel proveniente de amostras do meio de cultura onde as células foram cultivadas permitiu identificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados, indicando que as células extraídas apresentam a capacidade de produzir MEC colagenosa mesmo na ausência de fatores de maturação. **Figura 24.**



**Figura 23. Análise da produção de colágeno após 14 dias de cultivo.** A) Coloração com Sirius Red para identificação de colágeno. A imagem da esquerda representa células cultivadas em meio controle não osteogênico e nas imagens da direita as células foram cultivadas em meio com fatores osteogênicos. As imagens inferiores representam os poços de cultura após coloração por Sirius Red. Imagens superiores foram retiradas em aumento de 4x em microscópio óptico invertido. B) Gráfico representativo da análise quantitativa espectrofotométrica em absorbância de 555nm da produção de colágeno pelas células. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p < 0,05$ ).

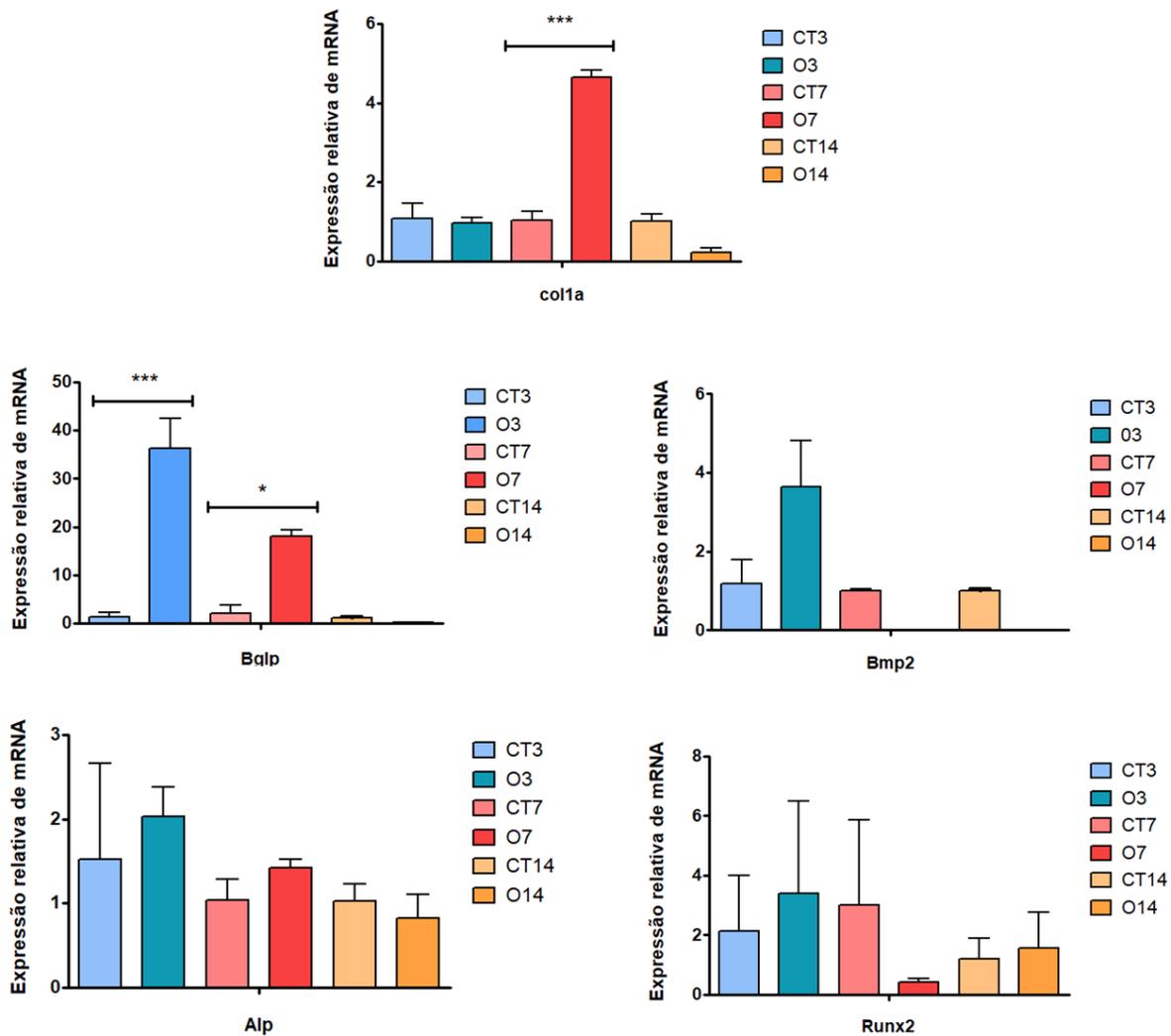
#### 4.2.2 Expressão gênica

Tendo em vista que a indução osteogênica gera a regulação da expressão de genes relacionados à maturação de osteoblastos, realizou-se análises do perfil de expressão gênica que permitiram identificar maiores níveis de expressão para Bmp2, Runx2, Alpl e Bglap no grupo de indução osteogênica após 3 dias de cultivo em relação ao grupo controle do mesmo dia. De forma semelhante, em 7 dias maior expressão de Colla1 e Bglap foi observada para o grupo osteogênico. No entanto, ao término de 14 dias, menores níveis para todos os genes foram observados no grupo osteogênico em comparação ao controle, cuja expressão de Runx2 foi acentuada. **Figura 25.**



**Figura 25. Heatmap de genes relacionados à maturação osteoblástica.** As colunas representam grupos estudados em diferentes momentos (3,7 e 14 dias), sendo CT grupo controle e O grupo osteogênico. Tons de verde indicam genes subexpressos e tons de vermelho indicam genes superexpressos.

A análise estatística desses dados permitiu a identificação de significância estatística para a expressão de *Colla1* em 7 dias, e para *Bglap* em 3 e 7 dias ao comparar o grupo osteogênico com o controle. Embora tal significância não tenha ocorrido em relação aos demais genes, observa-se um perfil de maturação osteoblástica no grupo tratado com fatores osteogênicos. **Figura 26.**

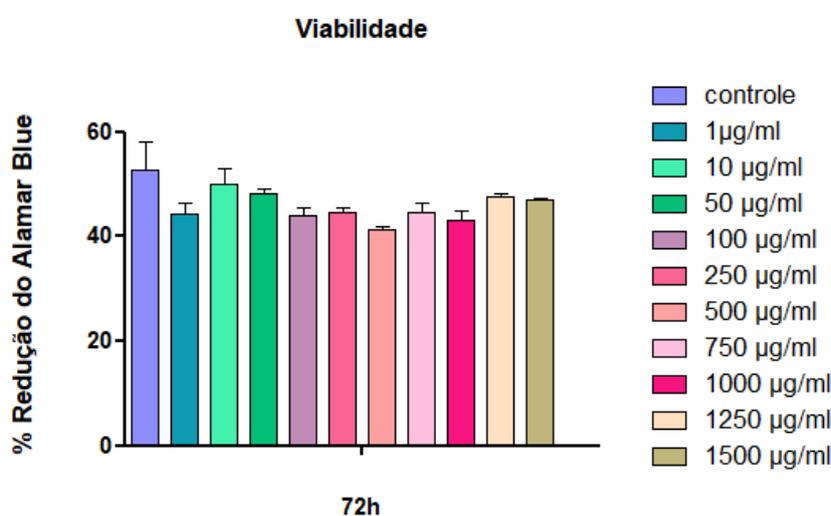


**Figura 26.** Representação gráfica da análise estatística do perfil de expressão de genes relacionados à maturação osteoblástica em 3,7 e 14 dias. CT= grupo controle e O = grupo osteogênico. Análise realizada com one-way ANOVA comparando-se os pares de coluna de cada dia. Significância estatística para valores de  $p < 0,05$ .

### 4.3 Citocompatibilidade das nanopartículas.

Para avaliar a citocompatibilidade das nanopartículas e determinar a concentração a ser utilizada na produção dos *scaffolds*, os osteoblastos foram expostos a diferentes concentrações de NPTB e a viabilidade celular foi avaliada após 72h.

Observou-se que embora tenha pequenas variações entre os grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre eles e nenhum padrão linear de queda ou aumento da viabilidade proporcional ao aumento da concentração foi observado (**Figura 27**). Assim, a concentração de 1000µg/ml foi selecionada para produção dos *scaffolds* tendo em vista que o uso desta concentração já foi descrita na literatura (157).



**Figura 27. Representação gráfica da viabilidade celular frente às diferentes concentrações de NPTB.** Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p < 0,05$ ), realizada com one-way ANOVA.

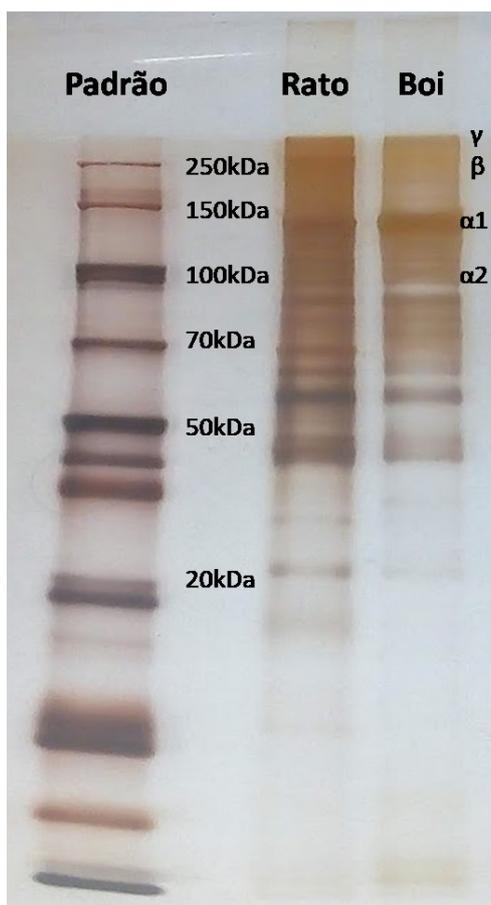
## 4.4 Caracterização dos biogéis de Colágeno

### 4.4.1 Eletroforese

A partir da determinação da concentração de uso das NPTB, realizou-se a extração de colágeno de cauda de ratos e colágeno de tendão bovino para a produção dos biogéis. As soluções de ambos os tipos de colágeno foram analisadas quanto à semelhança de suas composições por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida seguido pela coloração com a prata.

Por meio dessa análise pôde-se verificar que padrões de bandas semelhantes existem entre as amostras analisadas e que ambas apresentaram bandas características de colágeno para cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . No entanto, como esperado, foram identificadas diferenças entre os padrões de bandas das amostras. Maior marcação para bandas próximas de 250KDa, entre 70KDa e 50 KDa e em 20KDa foi observada para a amostra de colágeno de rato em comparação ao colágeno bovino. Por outro lado, o colágeno bovino apresentou uma banda maior próxima de 150KDa. **Figura 28.**

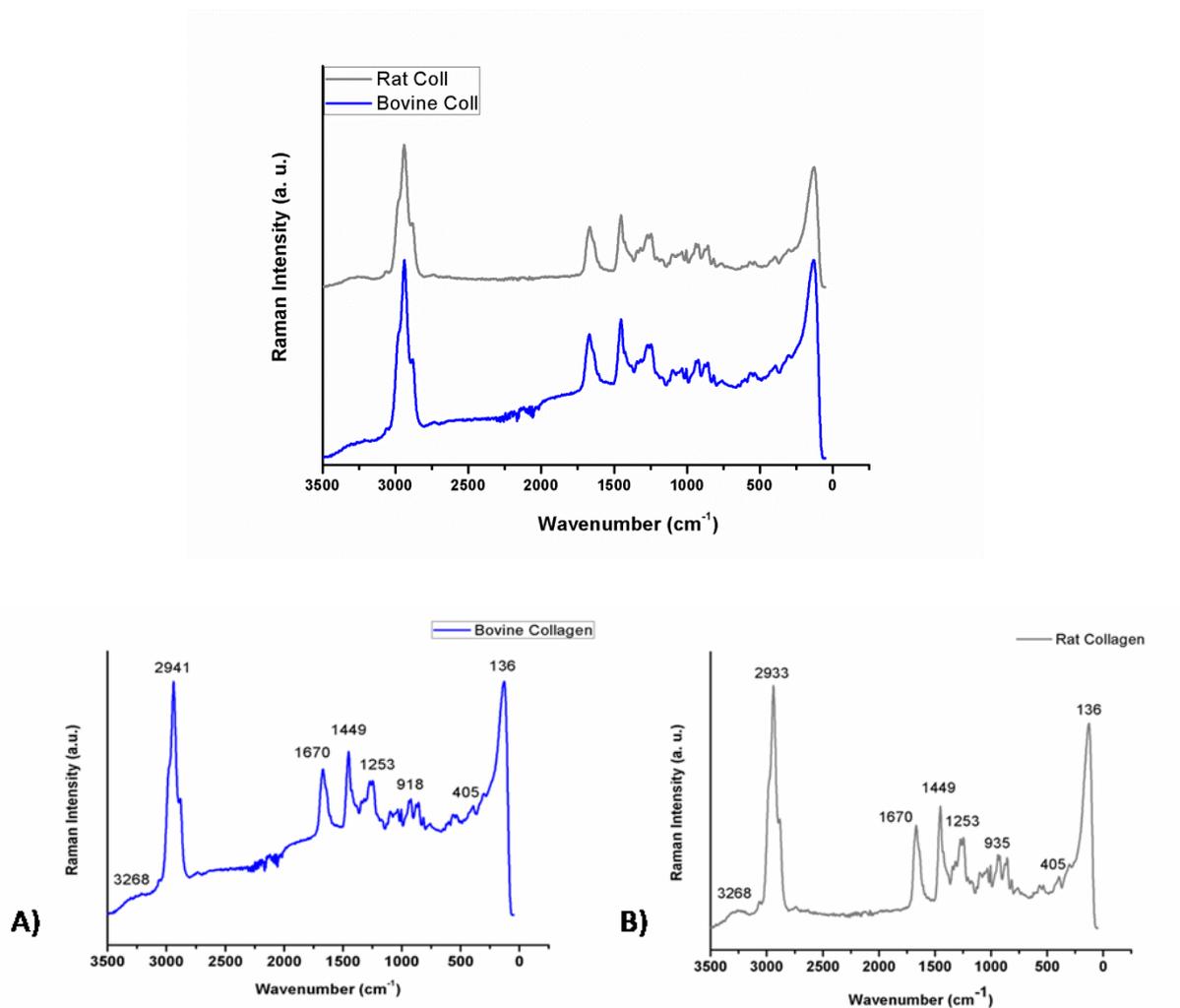
Tais observações permitem inferir que embora as amostras apresentem semelhanças e que tenham sido obtidas de tecidos conjuntivos semelhantes e ricos em colágeno, a intensidade das bandas indica que a concentração dos constituintes das amostras parece diferir.



**Figura 28.** Imagem representativa de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente de 10-15%. Observa-se padrão de bandas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  semelhante entre as espécies de colágeno bovino e de rato, embora com intensidades variando entre as amostras.

#### 4.4.2 Espectroscopia Raman do colágeno

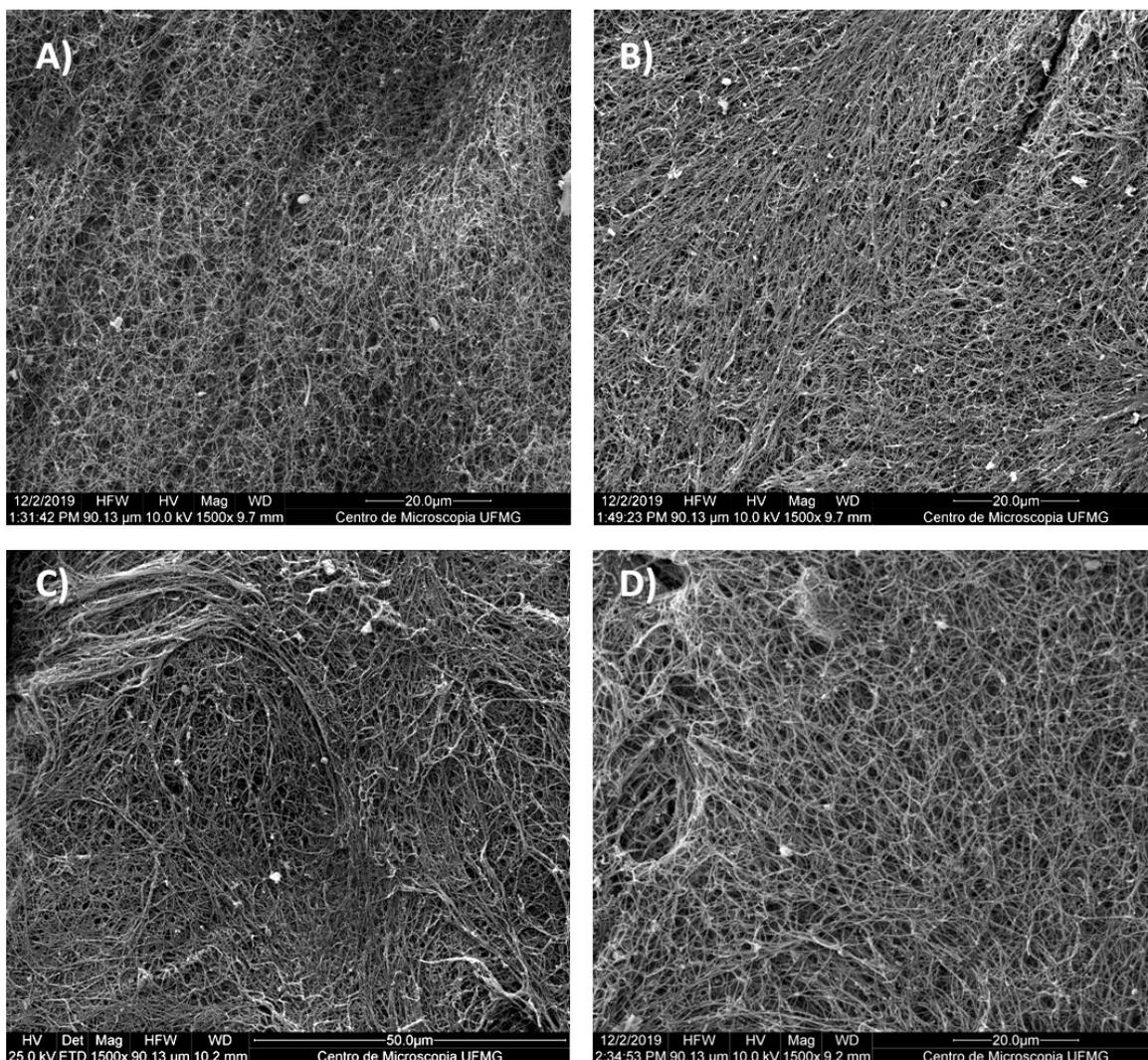
Com o objetivo de melhor caracterizar a semelhança na composição das amostras de colágeno, as mesmas foram liofilizadas e analisadas por espectroscopia Raman. Os espectros Raman obtidos permitiram visualizar que as amostras de colágeno de rato e colágeno bovino apresentam assinaturas espectrais de colágeno idênticas em:  $3268\text{cm}^{-1}$  (N-H),  $1670\text{cm}^{-1}$  (C=C e C=O),  $1449\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>),  $1253\text{cm}^{-1}$  (CN e N-H) e  $405\text{cm}^{-1}$  (vibrações da estrutura em tripla hélice). Os demais picos apresentaram grande proximidade para as regiões ao redor de  $3000\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>) e  $900\text{cm}^{-1}$  (C-C). Tais resultados estão de acordo com os dados obtidos por eletroforese (**Figura 27**) indicando que as amostras analisadas apresentam notável semelhança em suas composições. **Figura 29**.



**Figura 29. Espectroscopia Raman das amostras de colágeno bovino e de rato.** Observa-se em A) Semelhança do espectro de ambos os tipos de colágeno. B) Picos Raman do colágeno bovino e C) Picos Raman do colágeno de rato. Os gráficos mostram picos ocorrendo na faixa espectral de 0 a  $3500\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.4.3 Caracterização topográfica dos *scaffolds* de colágeno por MEV

Ambos os tipos de colágeno foram utilizados para produção dos *scaffolds*. Assim foram preparados *scaffolds* de colágeno de rato, colágeno de rato + NPTB, colágeno bovino e colágeno bovino + NPTB. Todos eles foram avaliados quanto suas características de superfície por meio de MEV. **Figura 30.**

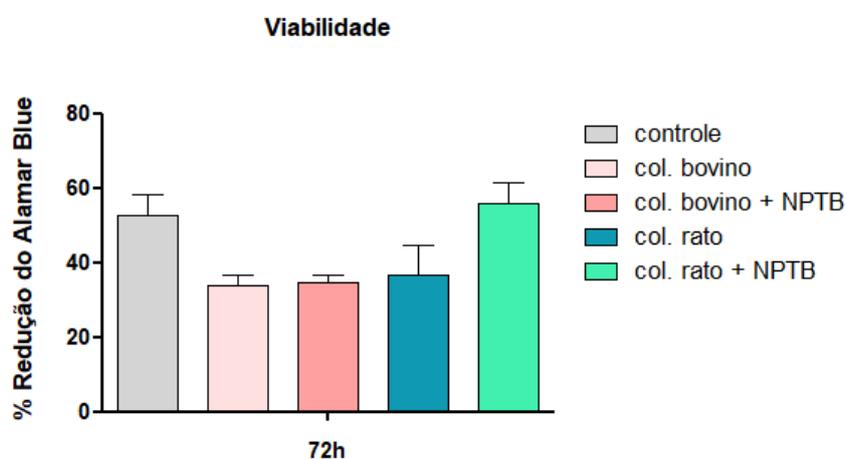


**Figura 30. MEV dos diferentes *scaffolds*.** A) Colágeno de rato, B) Colágeno de rato + NPTB, C) Colágeno bovino e D) Colágeno bovino + NPTB. Imagens capturadas em magnitude de 10.000x.

Observa-se que na superfície dos *scaffolds* as fibras colágenas apresentam-se de forma aleatória formando uma trama que parece não ser influenciada pela adição das nanopartículas. No entanto, no grupo colágeno de boi (**Figura 29 C e D**) observou-se áreas em que as fibras se encontravam orientadas em paralelo formando uma trama mais densamente agrupada.

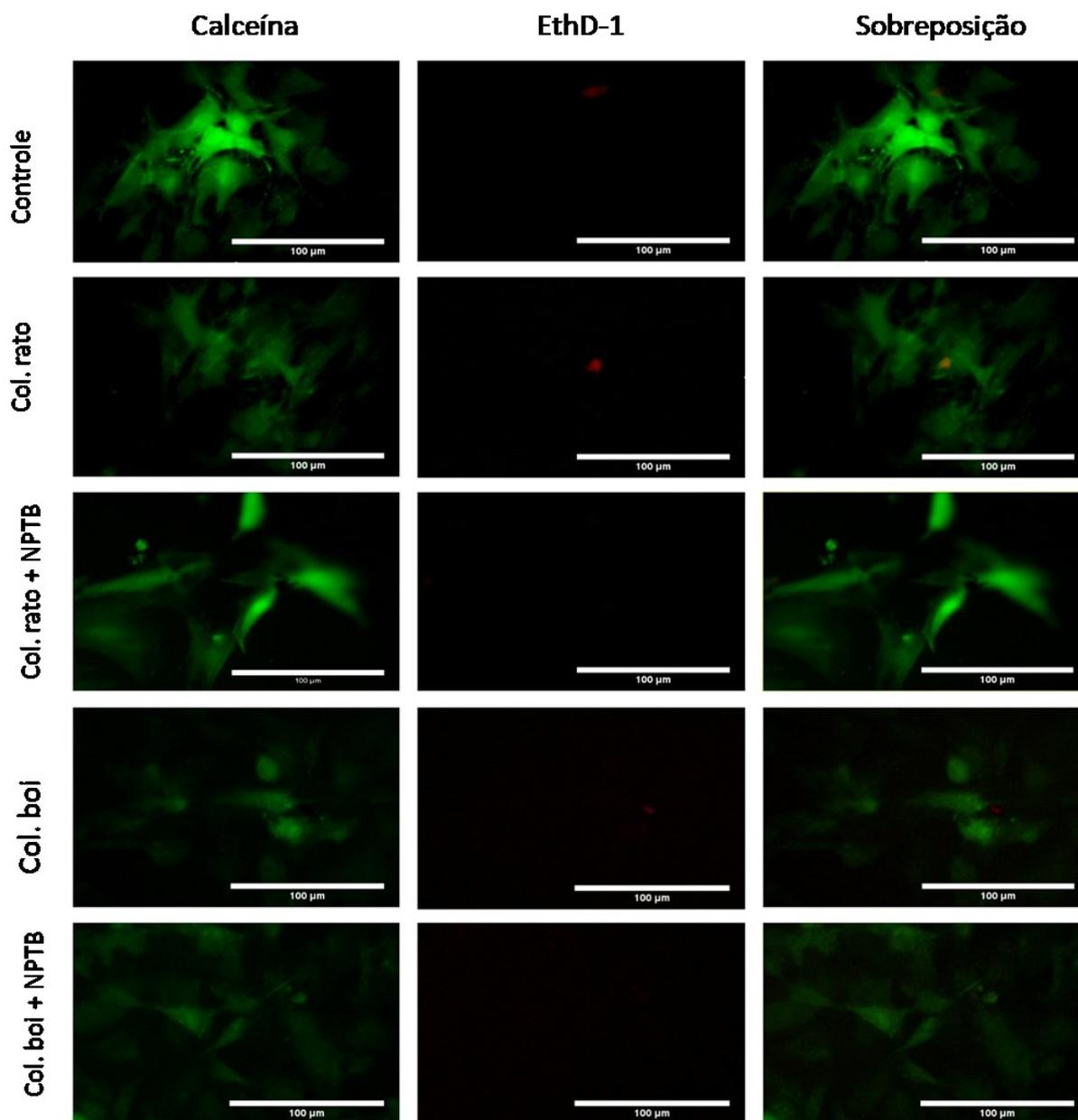
#### 4.5 Citocompatibilidade dos *scaffolds*

A fim de avaliar a citocompatibilidade dos *scaffolds* produzidos a partir de colágeno bovino e colágeno de rato, bem como de suas associações com as NPTB, realizou-se o ensaio de viabilidade celular com os osteoblastos primários de ratos neonatos, a partir do qual observou-se semelhança na viabilidade entre os grupos, não tendo sido identificada diferença estatisticamente significativa entre eles, demonstrando que independente da origem do colágeno os *scaffolds* produzidos apresentam citocompatibilidade na ausência e presença das NPTB. **Figura 31.**



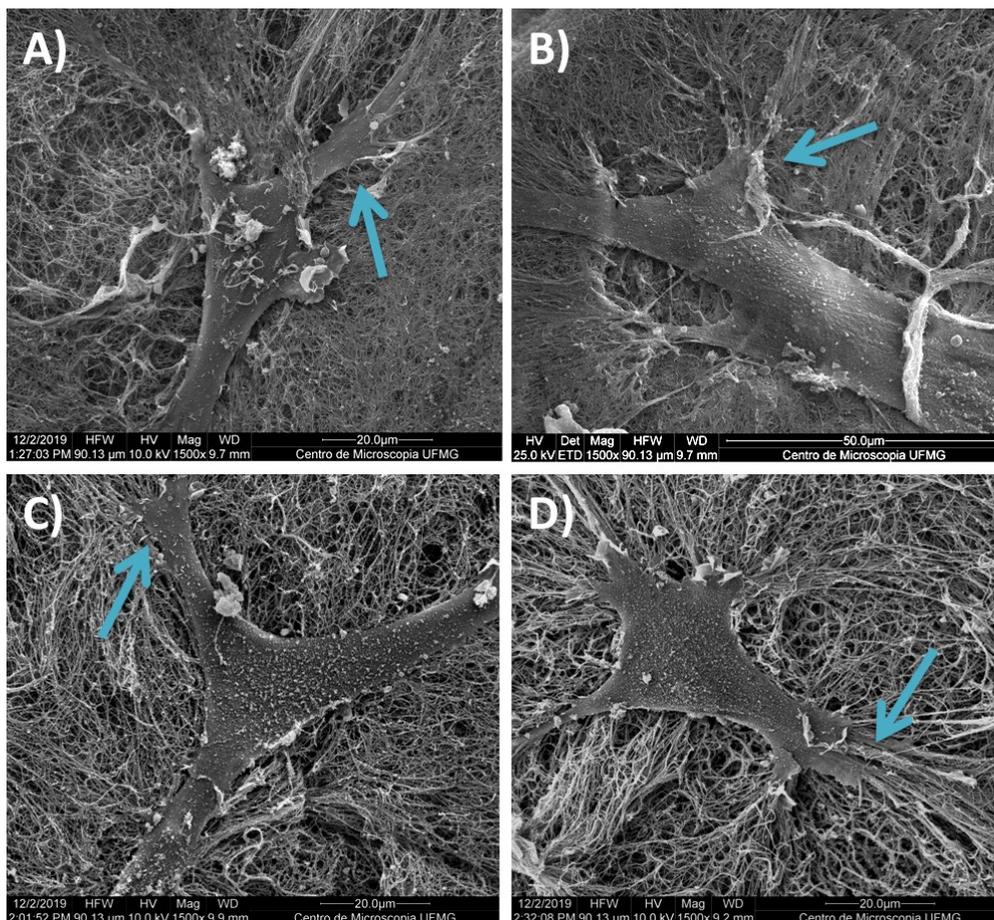
**Figura 31. Representação gráfica da viabilidade celular frente aos diferentes *scaffolds*.** Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p < 0,05$ ), realizada com one-way ANOVA.

Para confirmar a viabilidade celular também realizou-se análises por meio de microscopia de fluorescência utilizando-se marcador *LIFE/DEAD*. Tal análise permitiu a visualização de células viáveis na cor verde como resultado da metabolização da calceína e em vermelho as células não viáveis devido à marcação nuclear com EthD-1. Assim, observou-se que todos os grupos em estudo apresentaram notável marcação em verde em comparação com a vermelha, demonstrando a presença de células viáveis cultivadas nos diferentes *scaffolds* à base de colágeno como observa-se na **Figura 32.**



**Figura 32. Microscopia de fluorescência para análise da viabilidade Celular por meio de LIFE/DEAD.** Células viáveis marcadas em verde com calceína e as não viáveis marcadas em vermelho com homodímero-1 de etídio (EthD-1). Aumento de 10x.

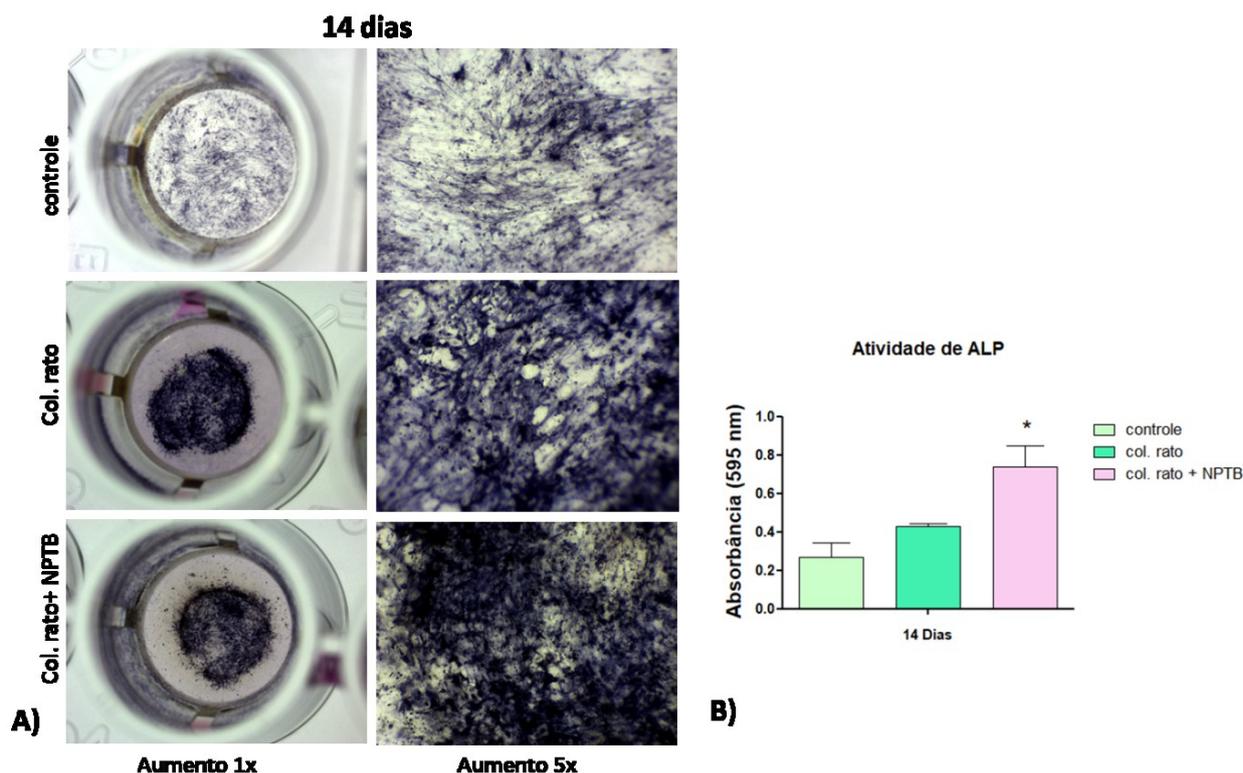
Tendo em vista que a morfologia celular é uma característica importante indicando se o material apresenta boa capacidade de bioadesão e assim osteointegração, realizou-se MEV para analisar a morfologia celular sobre a superfície dos diferentes *scaffolds*. É possível observar na **Figura 33** que os osteoblastos apresentaram aspecto alongado com tendência à morfologia estrelada e com muitos prolongamentos, apresentando diferentes pontos de fixação na matriz nos quatro tipos de *scaffolds* produzidos.



**Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura dos osteoblastos sobre os diferentes scaffolds.** A) Colágeno de rato, B) Colágeno de rato + NPTB, C) Colágeno bovino e D) Colágeno bovino + NPTB. As setas azuis indicam exemplos de prolongamentos celulares para adesão na superfície dos scaffolds. Imagens capturadas em magnitude de 1500x.

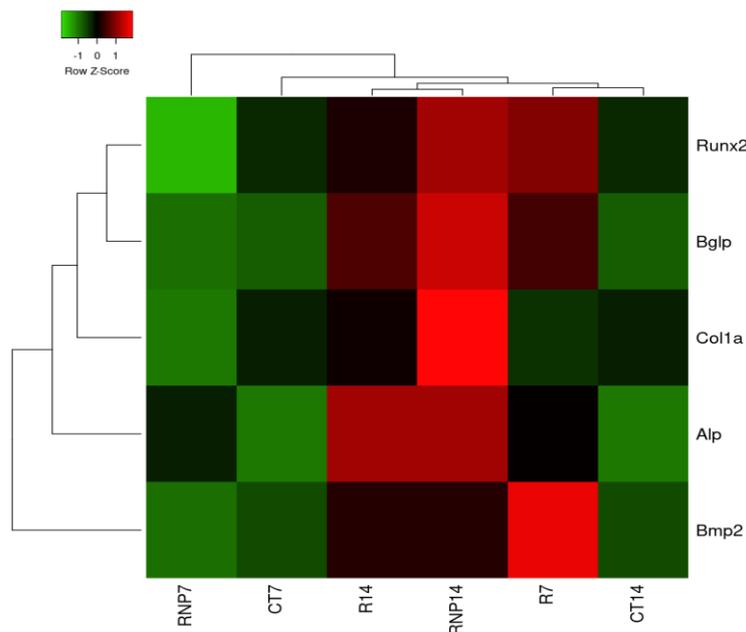
#### 4.6 Maturação osteoblástica nos *scaffolds* – Osteoindução

Tendo em vista a semelhança da citocompatibilidade entre os diferentes *scaffolds*, nos experimentos de osteoindução foram utilizados apenas os *scaffolds* produzidos à base de colágeno de rato. Sendo assim, realizou-se o ensaio da atividade de ALP por exposição das células aos substratos NBT-BCIP após 14 dias de cultivo. Como observado na **figura 34**, a atividade da enzima foi nitidamente favorecida nas células cultivadas sobre os biogéis em comparação às células do grupo controle cultivadas sobre a superfície plástica da placa de cultura. No entanto, embora ambos os *scaffolds* tenham sido favoráveis ao processo de maturação, ao realizar a solubilização e a leitura espectrofotométrica obteve-se resultado estatisticamente significativo para a atividade de ALP no grupo cujas células foram cultivadas sobre os *scaffolds* de colágeno com NPTB em comparação ao grupo controle, demonstrando importante perfil osteoindutor deste biogel. **Figura 34.**



**Figura 34. Atividade de fosfatase alcalina.** A) A imagem da esquerda em aumento de 1X representam os poços de cultura com osteoblastos cultivados sobre scaffold de Colágeno de rato associado à NPTB, sobre scaffold de colágeno de rato puro e sobre a superfície da placa de cultura sem scaffold (controle) após ação enzimática de fosfatase alcalina (ALP). Imagens da direita foram retiradas em aumento de 5x. B) Gráfico representativo da análise quantitativa espectrofotométrica em absorbância de 595nm da atividade enzimática de ALP após 14 dias de cultivo. Os valores estão representados pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes ( $p < 0,05$ ), realizada com one-way ANOVA.

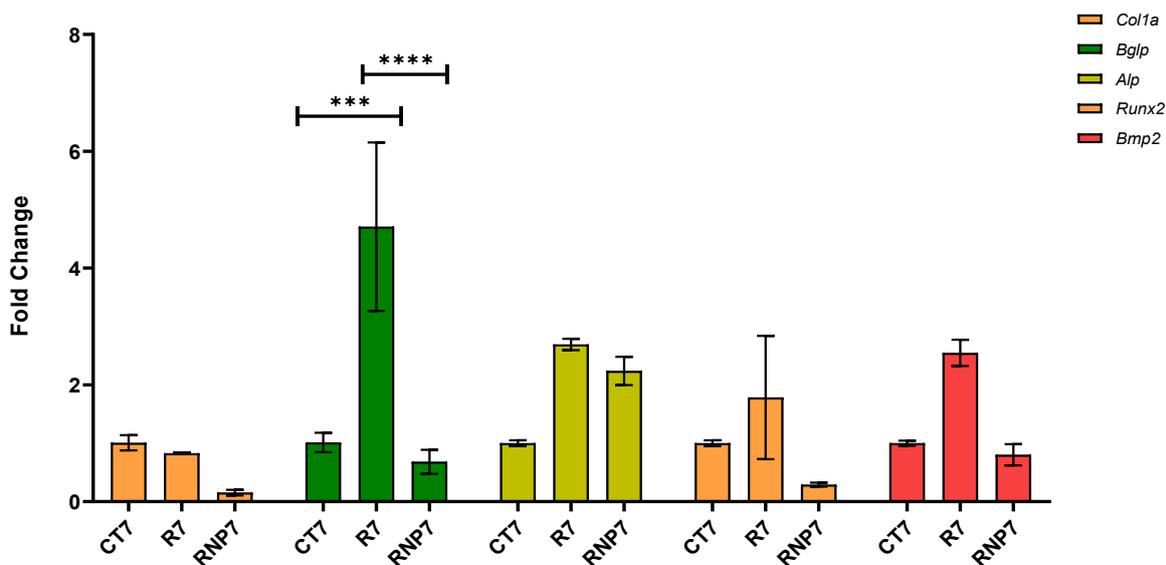
Em seguida, para analisara expressão de genes relacionados ao processo de maturação dos osteoblastos cultivados sobre os *scaffolds*, avaliou-se o nível de transcrição gênica por meio de qRT –PCR. Tal análise permitiu identificar uma baixa expressão de todos os genes em 7 e 14 dias de cultivo no grupo controle, cujas células foram cultivadas na superfície plástica das placas de cultura. No entanto, quando os osteoblastos foram cultivados sobre os *scaffolds* de colágeno e colágeno com NPTB maior expressão gênica foi observada principalmente em 14 dias. **Figura 35.**



**Figura 35. Heatmap de genes relacionados à maturação osteoblástica nos scaffolds.** As colunas representam grupos estudados em diferentes momentos (7 e 14 dias), sendo CT = grupo controle, R = colágeno de rato, RNP = colágeno de rato + NPTB. Tons de verde indicam genes subexpressos e tons de vermelho indicam genes superexpressos.

Para o grupo colágeno identificou-se maior expressão de Bmp2, Bglap e Runx2 no dia 7 em relação aos demais grupos no mesmo período. Essa expressão foi estatisticamente significativa para o gene Bglap, que codifica a osteocalcina, podendo indicar início da maturação nesse grupo já em 7 dias de cultivo, tendo em vista que a osteocalcina é um marcador de maturação osteoblástica. **Figura 36.**

Para o grupo colágeno com NPTB, observou-se baixos níveis de expressão de todos os genes em 7 dias, embora a expressão de Alpl nesse grupo tenha sido mais próxima à do grupo colágeno.



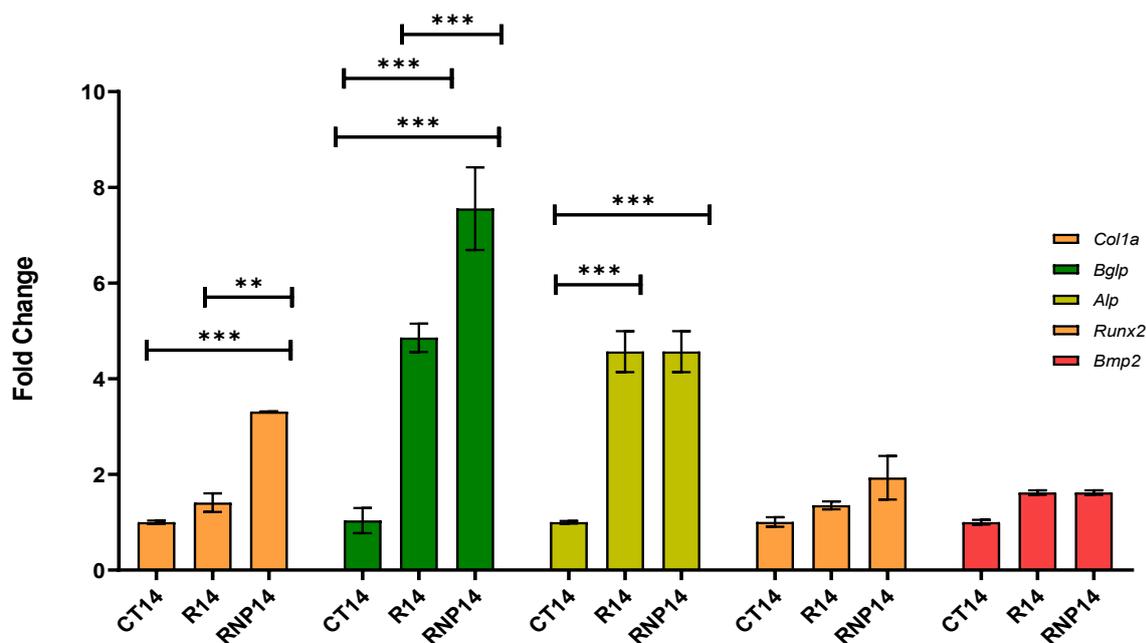
**Figura 36. Análise estatística do perfil de expressão gênica em 7 dias.** CT = grupo controle, R = colágeno de rato, RNP = colágeno de rato + NPTB. Análise estatística realizada com two-way ANOVA com significância estatística para valor de  $p < 0,05$ .

No entanto, após 14 dias de cultivo maior expressão de vários genes foi observada para o grupo colágeno com NPTB. O gene *Colla1* apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle e colágeno. O mesmo foi observado para *Bglap* embora esse tenha apresentado níveis muito mais elevados em relação ao *Colla1*.

O gene *Alpl* foi mais expresso tanto no grupo colágeno quanto no colágeno com NPTB, em níveis semelhantes entre eles. Para ambos os grupos identificou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Maior expressão de *Runx2* foi identificada para os grupos em que as células foram cultivadas sobre os *scaffolds*, tendo ocorrido maior expressão no grupo colágeno com NPTB, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Diferenças estatisticamente significativas também não foram observadas para os perfis de expressão de *Bmp2* em 14 dias de cultivo, embora maior expressão tenha ocorrido em ambos os grupos de *scaffolds* quando comparados ao controle, tendo tal expressão sido em níveis semelhantes entre eles. **Figura 37.**

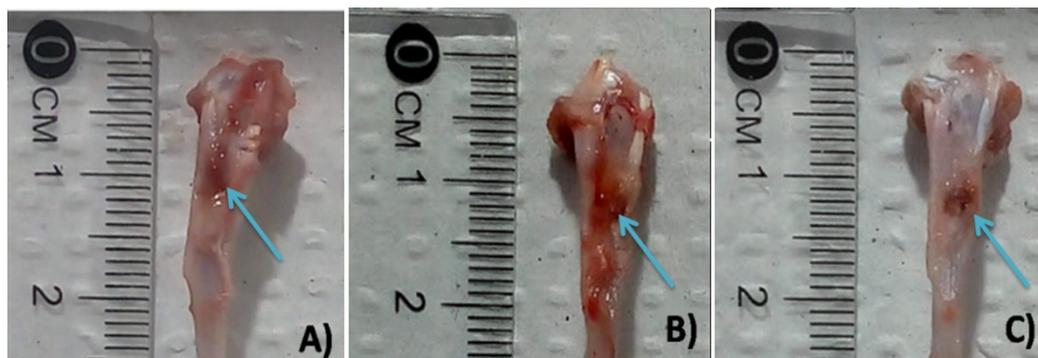


**Figura 37. Análise estatística do perfil de expressão gênica em 14 dias.** CT = grupo controle, R = colágeno de rato, RNP = colágeno de rato + NPTB. Análise estatística realizada com two-way ANOVA com significância estatística para valores de  $p < 0,05$ .

Assim, tendo em vista o favorável perfil de expressão de genes envolvidos com a maturação de osteoblastos ao término de 14 dias de experimentação, entende-se que o biogel de colágeno com NPTB possui potencial osteoindutor, mesmo na ausência de fatores de maturação no meio de cultura.

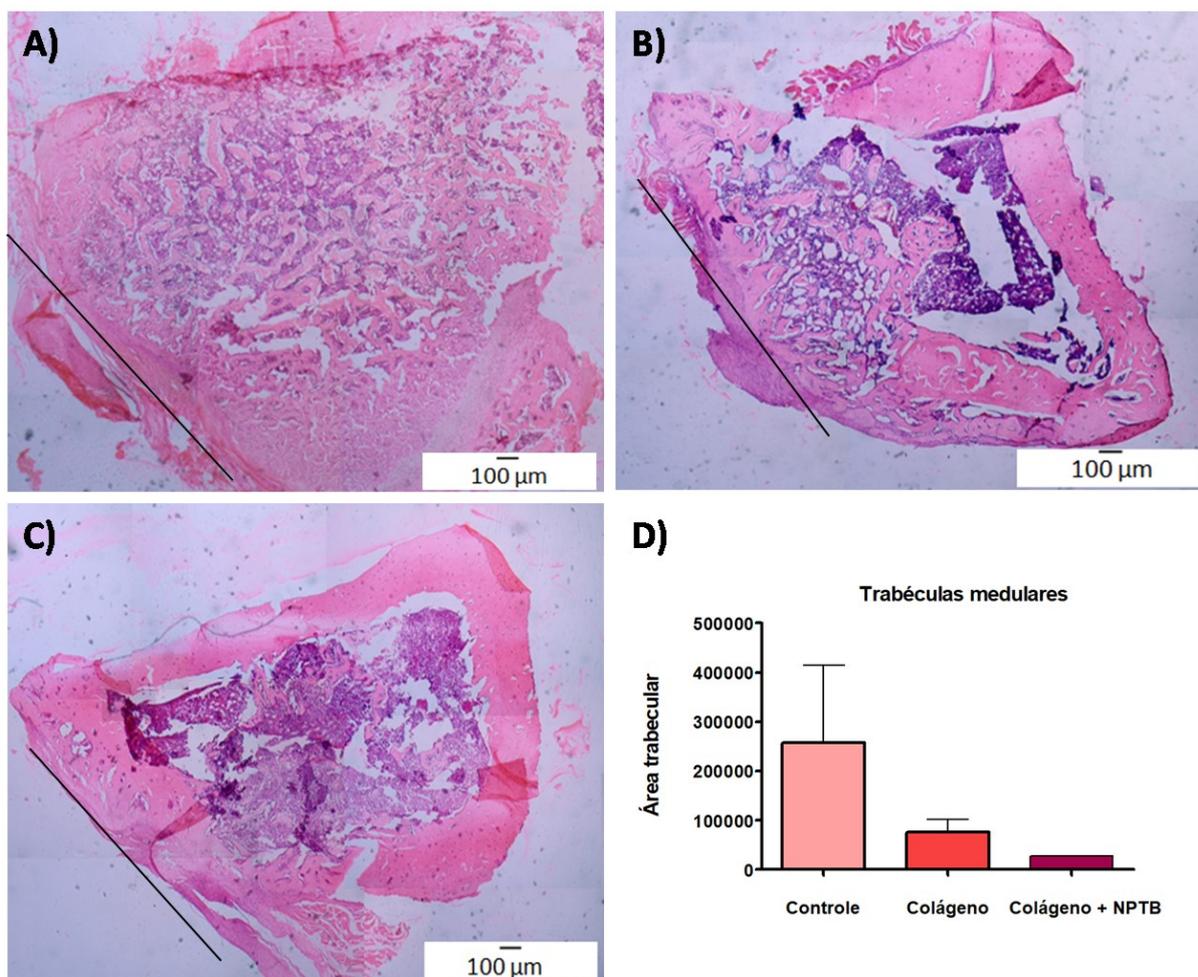
#### 4.7 Reparo ósseo – Aplicação *in vivo*

Tendo em vista o potencial osteoindutor dos *scaffolds*, realizou-se também estudo *in vivo* para identificar a capacidade do material em promover reparo ósseo. Para tal, utilizou-se um modelo de osteotomia de tíbia em ratos Wistar no qual a área da lesão foi tratada com *scaffold* de colágeno de rato ou colágeno de rato com NPTB, sendo que o grupo controle não recebeu tratamento. **Figura 38.**



**Figura 38.** Análise macroscópica da área da lesão óssea após 14 dias. Imagens representativas do A) grupo controle (sem adição de material), B) grupo colágeno (adição de scaffold de colágeno de rato) e em C) grupo colágeno com NPTB (adição de scaffold de colágeno de rato associado a NPTB).

Após 14 dias da lesão observou-se uma região maior da medula ocupada por trabéculas ósseas neoformadas no grupo controle quando comparado aos demais grupos, sendo que no grupo contendo NPTB a presença de trabéculas na região medular foi muito inferior. Também foi identificado osso neoformado na região cortical da lesão no grupo colágeno e principalmente no grupo colágeno com NPTB, sendo que no grupo controle não observou-se neoformação cortical na área da lesão indicando reparo tecidual retardado em relação aos grupos tratados com os *scaffolds*. **Figura 39.**



**Figura 39. Análise histológica da área da lesão após 14 dias.** Em A) grupo controle, B) grupo colágeno, C) grupo colágeno + NPTB. Coloração Hematoxilina e Eosina, aumento de 4X, escala da barra de 100 μm. Linha representando área da lesão. Em D) representação gráfica da área de invasão trabecular na região medular. Análise estatística realizada com two-way ANOVA com significância estatística para valor de  $p < 0,05$ .

Tendo em vista a neoformação de osso cortical na área da lesão e a menor área de invasão trabecular nos grupos tratados com os *scaffolds*, conclui-se que o reparo ósseo foi favorecido por meio do tratamento com os biogéis à base de colágeno, especialmente quando esses foram associados às NPTB.

## 5 DISCUSSÃO

O BaTiO<sub>3</sub> tem despertado interesse na área biomédica devido sua propriedade piezoelétrica e excelente biocompatibilidade (158). Os estudos de tal propriedade assim como de aspectos morfológicos das NPTB tem sido descritos em diversos trabalhos que mostram uma variedade muito grande de características como tamanho (159) (160) (161) e forma, tendo como exemplo as NPTB cúbicas, esféricas e em bastão (138). O tamanho de uma nanopartícula apresenta importante influência do ponto de vista biológico tendo em vista sua possibilidade de ser endocitada, de sofrer biodistribuição e eliminação do organismo (162).

Tendo em vista a importância que o tamanho das NPTB apresenta nas respostas biológicas, o mesmo também apresenta grande relação com suas propriedades piezoelétricas. Em um estudo com BaTiO<sub>3</sub> variando de 290nm até 8,61  $\mu$ m, identificou-se que maior efeito piezoelétrico ocorre para partículas com diâmetro próximo de 1 $\mu$ m (161). No que diz respeito à nanopartículas ferroelétricas com diâmetro abaixo de 100nm, existe uma relação direta entre presença de propriedade piezoelétrica e tamanho, sendo assim quanto menor a nanopartícula menor a capacidade piezoelétrica do material (163).

As NPTB do presente estudo apresentaram diâmetro aproximado de 60nm que foi identificado por meio de análises de AFM e MEV. A morfologia observada nas imagens de MEV foi de nanopartículas esféricas com tendência ao aspecto cúbico. A fim de caracterizar as propriedades elétricas de tais nanopartículas, elas foram inicialmente estudadas quanto à carga de superfície quando dispersas em meio de cultura, a partir do qual identificou-se potencial Zeta negativo de -11,17mV. A carga na superfície de nanopartículas apresenta importante influência no que diz respeito à viabilidade celular já tendo sido relatada maior viabilidade quando as nanopartículas são carregadas positivamente em relação às neutras e as negativamente carregadas (164).

No entanto, tratando-se de materiais cerâmicos têm-se observado uma favorável relação entre polarização negativa e células de tecido ósseo. Um estudo revelou que osteoblastos cultivados sobre filmes de HA polarizada negativamente apresentaram maior proliferação após 42h de cultivo quando comparado ao grupo com HA positivamente polarizada (165). É sabido que a polarização do BaTiO<sub>3</sub> é dependente de sua estrutura cristalina em fase tetragonal (166), sendo que sua caracterização tem sido realizada por meio de técnicas como espectroscopia por infravermelho, difração de raios-X (167) e a espectroscopia Raman (168). Sabe-se que picos Raman localizados nas regiões ao redor de

307  $\text{cm}^{-1}$  e 715  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à estrutura tetraédrica das NPTB, embora picos próximos de 175, 520  $\text{cm}^{-1}$  e 265  $\text{cm}^{-1}$  também tenham sido associados à fase cristalina assimétrica (169). No presente estudo obteve-se picos Raman para NPTB em 307  $\text{cm}^{-1}$  e 715  $\text{cm}^{-1}$ , caracterizando o material como em fase tetragonal característica de ser piezoelétrico. Um pico Raman em 79  $\text{cm}^{-1}$  também foi observado no presente trabalho, tal achado foi descrito por um trabalho prévio o qual descreveu que a presença de picos próximos a região de 70  $\text{cm}^{-1}$  relacionam-se à vibrações decorrentes dos átomos de bário nas NPTB, enquanto que as vibrações dos átomos de titânio e oxigênio são identificadas por meio dos mesmos picos referentes às regiões que caracterizam a fase tetragonal (169).

A identificação de elementos químicos na amostra de NPTB também foi realizada por EDS. Tal análise revelou a presença de bário, titânio, oxigênio, carbono, sódio e silício. Uhl *et al.* 2020 descreveram a presença de um pico referente ao sódio em amostras de NPTB analisadas por meio de EDS, sendo esse achado relacionado à presença de resíduos provenientes das etapas de síntese das nanopartículas. Precursores como carbonato de bário e titanato de sódio são frequentemente utilizados para a síntese do titanato de bário, podendo os elementos químicos destes serem identificados no produto final da síntese, o que poderia explicar a presença de carbono e sódio nas amostras no presente trabalho (158).

Considerando que as NPTB em estudo apresentaram composição química e estruturação cristalina típica de NPTB piezoelétricas, realizou-se análises do perfil condutor das nanopartículas por meio de EFM para caracterização de propriedades elétricas. Tendo em vista que a matriz óssea apresenta naturalmente propriedade piezoelétrica importante na ativação celular, as análises realizadas no presente trabalho permitiram a identificação de perfil pouco condutor em NPTB, sendo esse um achado que condiz com relatos da literatura, os quais descrevem os materiais piezoelétricos como sendo de baixa condutividade. Tal característica foi observada por Parizi *et al.* 2014 que por meio de EFM analisou um filme de NPTB cúbicas com 15nm de diâmetro e identificou que as mesmas apresentam alta resistência a condução elétrica. De modo semelhante Nuraje *et al.* 2006 investigou a presença de ferroeletricidade em NPTB de 12nm de diâmetro por meio de EFM observando a presença de contraste entre as NPTB mais claras e o substrato condutor escuro nas imagens obtidas. Tais relatos corroboram os achados do presente estudo que caracterizam as NPTB como material piezoelétrico de baixa condutividade. As características elétricas das NPTB vem sendo exploradas em aplicações biológicas no contexto de reparo ósseo e regeneração. Uma investigação sobre o efeito de revestimentos  $\text{BaTiO}_3$  para implantes na diferenciação

osteogênica de células Saos-2, célula derivada de osteossarcoma humano, identificou que maior crescimento celular e diferenciação osteogênica ocorreram na presença de revestimentos com propriedade ferroelétrica, o que foi identificado por meio de maior marcação de ALP e osteocalcina, sendo que além disso a presença do BaTiO<sub>3</sub> não interferiu na viabilidade celular (170). Sabe-se que a viabilidade celular é uma importante condição para a aplicação biológica de nanomateriais e tem sido demonstrado que variadas concentrações de NPTB não apresentam influência significativa sobre a viabilidade celular (157). Os resultados observados no presente trabalho corroboram com a literatura, no qual concentrações crescentes de NPTB entre 1µg/ml a 1500µg/ml foram testadas em cultura primária de osteoblastos de rato. Os resultados mostraram ainda que não houve relação linear entre aumento da concentração e alterações na viabilidade celular, indicando boa citocompatibilidade das NPTB com células específicas do tecido ósseo. Tendo em vista tal citocompatibilidade acreditou-se que a associação de NPTB com colágeno, proteína encontrada naturalmente nos ossos, seria capaz de promover a formação de um *scaffold* com propriedades de osteoindução.

O colágeno é o principal componente orgânico do tecido ósseo e um dos biomateriais amplamente estudados para aplicação em engenharia de tecidos. A caracterização de biomateriais à base de colágeno busca identificar sua composição química, estrutura molecular e organização (171). Já foi descrito que amostras de colágeno tipo I analisadas por meio de eletroforese devem apresentar um padrão de bandas no qual seja possível identificar cadeias  $\alpha 1$  em bandas de 135KDa e cadeias  $\alpha 2$  em 100KDa (172). No presente estudo observou-se que a amostra de colágeno bovino possui maior intensidade para a região de cadeias  $\alpha 1$  em relação ao colágeno de rato. No entanto, ambas as amostras apresentaram padrão similar para região de cadeias  $\alpha 2$ , que foram menos intensas em relação as bandas de cadeia  $\alpha 1$ . Tal achado está de acordo com dados prévios da literatura que relatam um perfil de intensidade descrito como 2:1 tendo em vista a maior proporção de cadeias  $\alpha 1$  em relação as cadeias  $\alpha 2$  na constituição da molécula de colágeno tipo I (173). Para as amostras obtidas também observou-se a presença de marcação para bandas características de cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ . Tais cadeias são respectivamente dímeros e trímeros de cadeias  $\alpha$  compreendidos como componentes de alto peso molecular que são identificados em bandas nas regiões de 245KDa para cadeias  $\beta$  e logo acima disso para cadeias  $\gamma$  (172). Foi observado que uma banda levemente mais intensa acima de 250KDa ocorreu para o colágeno de rato, a qual pode ser proveniente do método de obtenção do colágeno. As amostras obtidas a partir das caldas de

ratos não foram tratadas enzimaticamente como as amostras de colágeno bovino. Tal diferença poderia justificar o padrão levemente mais intenso para a região de maior peso molecular no colágeno de rato tendo em vista que em trabalhos prévios, a utilização de proteinases gerou a diminuição na intensidade das bandas nesta região (173, 174).

Bandas abaixo de 100KDa também ocorreram para ambas as amostras. A identificação de bandas de menor peso molecular pode estar relacionada à presença de fragmentos gerados durante o processo de extração por método enzimático (174). Tendo em vista que as amostras de colágeno de rato não foram tratadas enzimaticamente e que as bandas abaixo de 100KDa foram presentes nos dois tipos de colágeno, a presença de tais bandas em ambas as amostras poderia ser proveniente de moléculas não colágenas presentes nos tecidos tendíneos utilizados para extração, como observado por Aro *et al.* 2014 (175).

Outra forma proposta para caracterizar a semelhança na composição de amostras de colágeno compreende a espectroscopia Raman. Tal técnica é apontada como sensível para a identificação de componentes moleculares da matriz extracelular (176). Albro *et al.* 2018 utilizou a espectroscopia Raman para investigar as características de tecido cartilaginoso e de *scaffolds* desenvolvidos com a finalidade de aplicação em reparo de cartilagem, identificando que os achados obtidos dentro do espectro de  $800\text{-}1800\text{cm}^{-1}$  para as assinaturas referentes à glicosaminoglicanos, água e colágeno apresentaram forte conformidade com dados obtidos de análises bioquímicas (177). O espectro Raman de amostras de colágeno normalmente apresenta um pico de grande intensidade próximo de  $3000\text{cm}^{-1}$  que está relacionado à presença de grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> de cadeias laterais de aminoácidos. Próximo dessa região é comum a identificação de uma banda entre  $3100\text{-}3600\text{cm}^{-1}$  com intensidade inferior e que está relacionada à um *background* do conteúdo de água na amostra (178). Tal banda não foi visível no grupo colágeno de boi e apresentou uma baixa intensidade no colágeno de rato no presente trabalho. Esses achados condizem com a condição das amostras tendo em vista que ambas foram previamente liofilizadas. No entanto, relatos de bandas nesta região também já foram relacionados às vibrações provenientes de ligações N-H de amidas em proteínas (179).

Conforme a literatura, bandas de amida em amostras de colágeno analisadas por espectroscopia Raman representam a formação de ligações peptídicas entre grupos N-H de aminoácidos glicina e C=O de prolina indicando a estruturação em tripla hélice das cadeias peptídicas (179). Apesar da relação com amidas na região entre  $3100\text{-}3600\text{cm}^{-1}$ , as assinaturas para amida I são normalmente identificadas na região entre  $1650\text{ e }1680\text{cm}^{-1}$  (C=O e C=C),

sendo as de amida III relatadas para as regiões entre 1230 e 1280 $\text{cm}^{-1}$  (C-N e N-H) (176, 178). Ambas as amostras analisadas no presente estudo apresentam picos localizados dentro das referidas faixas espectrais demonstrando a presença de organização estrutural subfibrilar em tripla hélice. Entre as regiões referentes às amidas, observou-se um pico em 1449  $\text{cm}^{-1}$  para ambas as amostras. Tal pico já foi descrito como sendo proveniente de grupos CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub> de proteínas (180).

Assinaturas para Glicosaminoglicanos (S=O) e lipídeos (C-C) podem ser identificadas nas regiões de 1068 e 1080 $\text{cm}^{-1}$  respectivamente em proximidade com um local onde também identifica-se assinaturas referentes ao colágeno e que são provenientes do conteúdo de prolina, hidroxiprolina, assim como de  $\alpha$ hélices na amostra (176). Tais assinaturas, encontradas na faixa entre 820 e 939 $\text{cm}^{-1}$ , apresentaram pequena variação no valor de picos entre o colágeno bovino e o colágeno de rato embora ambos encontrem-se dentro da faixa espectral referida e apresentando semelhança com o padrão de picos Raman identificados em outros estudos (181). A semelhança entre amostras de colágenos tipo I bovino e de rato foi investigada por meio de espectroscopia Raman por um grupo que identificou que ambas as amostras apresentam muita semelhança do ponto de vista da assinatura dos picos e de suas intensidades, sendo as pequenas diferenças atribuídas a aspectos conformacionais na amostra. A literatura também aponta que os picos em 1670 $\text{cm}^{-1}$ , 1250 $\text{cm}^{-1}$  e 940 $\text{cm}^{-1}$  caracterizam a disposição aleatória das fibras estudadas (182).

Tais descrições são semelhantes ao encontrado no presente estudo, no entanto observou-se que para as amostras de colágeno bovino uma notável maior intensidade foi obtida em toda faixa espectral onde encontra-se a assinatura do colágeno (700-1800 $\text{cm}^{-1}$ )(179). Está descrito na literatura que fatores como concentração dos constituintes da MEC, assim como a disposição das fibras interferem nas intensidades dos picos (177, 179). Tendo em vista que as amostras de colágeno bovino analisadas por meio de MEV apresentaram uma trama em cujas fibras estavam dispostas em paralelo e mais densamente agrupadas, acredita-se que tal organização tenha influenciado a intensidade das assinaturas espectrais embora ambas as amostras apresentem picos que apontam para uma composição molecular semelhante.

Moléculas de colágeno utilizadas para produção de *scaffolds* já mostraram ser biocompatíveis, permitindo a adesão e proliferação celular (183). Além disso, *scaffolds* de colágeno em associação com outros materiais como o fosfato tricálcico são capazes de induzir

maior mineralização, atividade de ALP e produção de osteopontina quando tais *scaffolds* são cultivados com pré-osteoblastos MC3T3-E1 (184). Ao investigar o potencial osteogênico de *scaffolds* de colágeno com HA Calabrese *et al.* 2016 mostraram que a diferenciação osteogênica de células tronco ocorreu mesmo na ausência dos fatores químicos de diferenciação no meio de cultura (185). Esses relatos demonstram o potencial do colágeno em favorecer a diferenciação osteogênica e maturação osteoblástica quando em associação com materiais cuja composição e/ou propriedades físicas são semelhantes as do tecido ósseo. Embora o colágeno já tenha sido amplamente utilizado na produção de diversos compósitos, sua associação com BaTiO<sub>3</sub> tem sido pouco estudada. Zanfiri *et al.* 2016 investigaram a utilização de colágeno com HA e colágeno com HA acrescido de NPTB para produção de *scaffolds* com potencial osteoindutor, os quais foram testados *in vitro* com células tronco humanas obtidas de fluido amniótico. Em tal trabalho os autores observaram que as células apresentaram capacidade de adesão e distribuição uniforme sobre ambos os tipos de *scaffolds*. No entanto, após uma semana de cultivo, as análises de expressão gênica revelaram que maior expressão dos genes para BMP1, osteopontina, colágeno e ALP foi identificada para o grupo contendo NPTB em relação ao grupo formado apenas por colágeno e HA, tendo os resultados favoráveis sido atribuídos às propriedades ferroelétricas das NPTB (186).

Apesar do curto período experimental de 7 dias realizado por Zanfiri *et al.* 2016 resultados semelhantes foram obtidos no presente trabalho no qual identificou-se que após 14 dias de cultivo ambos os *scaffolds* induziram níveis semelhantes de expressão gênica para ALP, os quais foram significativamente maiores em relação ao controle, no entanto a presença de NPTB nos *scaffolds* promoveu maior expressão dos genes *Colla1* e *Bglap* em relação aos grupos colágeno e controle. Como previamente descrito na literatura, o colágeno produzido pelas células ósseas durante a diferenciação e maturação osteoblástica atua como um marcador inicial de tal processo, seguido por ALP como marcador intermediário e osteocalcina como marcador tardio (170). Tal descrição permite concluir que no presente estudo ao término de 14 dias, maior maturação ocorreu para o grupo contendo as NPTB, embora o grupo colágeno tenha gerado expressão significativa de *Colla1* e *Bglap* em 7 dias.

A influência da MEC na regulação da expressão de genes relacionados à osteogênese se dá por meio da interação de integrinas  $\alpha1\beta1$  da membrana celular com o colágeno, o que gera ativação da via de MAPK levando a fosforilação e regulação da atividade transcricional de Runx2 (187). Tendo em vista que genes como *Colla1* e *Bglap* são regulados por Runx2

(24), tal descrição poderia justificar a observação de que o colágeno na ausência de NPTB foi capaz de induzir uma maior expressão desses genes em 7 dias de cultivo, embora tais níveis tenham sido inferiores aos do grupo com NPTB em 14 dias.

Uma vez que a morfologia celular é uma característica importante de ser avaliada na viabilidade e diferenciação celular, observou-se no presente estudo que os osteoblastos apresentaram-se aderidos à superfície dos diferentes *scaffolds* com formação de inúmeros prolongamentos, os quais conferiram a eles o aspecto alongado semelhante à fibroblastos, embora uma tendência a morfologia estrelada também tenha sido observada, como identificado no trabalho de Gutierrez-Prieto *et al.* 2019 que estudou osteoblastos humanos cultivados sobre *scaffolds* de colágeno bovino (188). Uma morfologia muito semelhante foi relatada para osteoblastos MC3T3-E1 cultivados sobre *scaffolds* produzidos com colágeno originado de pele de bezerro e incorporados com apatita CO<sub>3</sub>, sobre os quais observou-se que as células foram hábeis em produzir novas fibras de colágeno e migrar para o interior dos *scaffolds* após 10 dias de cultivo (189).

Apesar dos estudos *in vitro* gerarem informações importantes a cerca da citotoxicidade e comportamento celular, trabalhos *in vivo* se fazem fundamentais na abordagem sistêmica dos efeitos de novas terapias. Não há muitos estudos que tenham investigado a aplicação de *scaffolds* com NPTB em modelos de reparo ósseo. Uma investigação sobre o uso de MEC óssea descelularizada e coberta com NPTB para implantação em lesão óssea de 8mm em mandíbulas de coelhos mostrou induzir maior formação óssea após 4 e 12 semanas quando comparado ao grupo controle além de maior angiogênese e produção de osteocalcina no tecido.

A osteocalcina é uma glicoproteína não colágena sendo a mais abundante do tecido ósseo, que além de servir como marcador de maturação osteoblástica atua gerando sinalização para reabsorção e formação óssea, exercendo importante função no processo de mineralização tendo em vista sua afinidade por íons cálcio (190, 191). A importância dessa glicoproteína foi demonstrada em um estudo realizado por Carvalho *et al.*, no qual células tronco da medula óssea foram cultivadas sobre *scaffolds* de colágeno tipo I associados com osteocalcina e/ou osteopontina. Os *scaffolds* produzidos por eles foram biocompatíveis e osteoindutores, além de apresentarem o potencial de promover angiogênese. No mesmo trabalho foi investigada a utilização dos *scaffolds* em um modelo de lesão em ossos longos de coelhos, para os quais observou-se após 6 semanas a formação de novo tecido na área da lesão, na qual também

foram identificados osteoblastos e ausência de sinais de inflamação, infecção e reação de corpo estranho (192). Semelhantemente aos relatos na literatura, os *scaffolds* à base de colágeno desenvolvidos no presente estudo apresentaram potencial de induzir maior formação e reparo ósseo, especialmente na presença de NPTB, tendo sido evidenciado pela maior formação de osso cortical e remodelamento do espaço medular. No entanto, apesar de terem sido identificados como biocompatíveis e terem apresentado favorável osteoindução, tendo em vista a maior atividade de ALP e expressão de marcadores de maturação como osteocalcina e colágeno, mais estudos devem ser realizados investigando a biocompatibilidade com células humanas, potencial angiogênico, biodistribuição, respostas sistêmicas às nanopartículas e suas associações com colágeno de diferentes espécies animais, assim como estudos avançados da microestrutura e qualidade óssea gerada durante o processo de reparo *in vivo*.

Sendo assim, o presente trabalho demonstra que os *scaffolds* à base de colágeno associados com as NPTB piezoelétricas são biocompatíveis, osteoindutores e apresentam potencial para aplicações terapêuticas tendo em vista a capacidade de favorecerem o processo de reparo ósseo.

## 6 CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho são:

- As NPTB estudadas possuem as características químicas, físicas e morfológicas típicas de NPTB piezoelétricas além de não apresentarem citotoxicidade para osteoblastos de rato.
- As amostras de colágeno bovino e de rato obtidas são muito semelhantes e formam um *scaffold* citocompatível na ausência e presença de NPTB.
- A maturação osteoblástica é favorecida ao cultivar as células sobre os *scaffolds* de colágeno de rato com as NPTB sendo tal maturação evidenciada pela maior atividade de ALP e significativa expressão de genes relacionados à maturação osteoblástica, como *Col1a1*, *Bglap* e *Alpl*.
- Os *scaffolds* de colágeno com NPTB são capazes de favorecer maior reparo ósseo em modelo de osteotomia de tíbia em ratos.

## 7 PERSPECTIVAS

- Concluir análises histológicas da área da lesão óssea de 7 e 14 dias após tratamento com os *scaffolds*.
- Avaliar a angiogênese na área da lesão óssea tratada com os *scaffolds*.
- Estudar a biodistribuição *in vivo* das NPTB em órgãos de *clearance* (baço, fígado e rins).
- Realizar estudos de propriedades mecânicas dos ossos tratados com os *scaffolds*.
- Realizar estudos da qualidade e microestrutura óssea.
- Estudar *in vitro* a osteoindução com células tronco humanas cultivadas nos *scaffolds*.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143-62.
2. Zhu L, Luo D, Liu Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *International Journal of Oral Science*. 2020;12(1):6.
3. Li J, Liu X, Crook JM, Wallace GG. Electrical stimulation-induced osteogenesis of human adipose derived stem cells using a conductive graphene-cellulose scaffold. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2020;107:110312.
4. Unal M, Cingoz F, Bagcioglu C, Sozer Y, Akkus O. Interrelationships between electrical, mechanical and hydration properties of cortical bone. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2018;77:12-23.
5. Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, Steck R, Glatt V, Dickinson IC, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions — A 21st Century Perspective. *Bone research*. 2013;1(1):216-48.
6. Dang M, Saunders L, Niu X, Fan Y, Ma PX. Biomimetic delivery of signals for bone tissue engineering. *Bone research*. 2018;6(1):25.
7. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. 2018;6:16.
8. Buck DW, 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plastic and reconstructive surgery*. 2012;129(6):1314-20.
9. Ono T, Nakashima T. Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and cell biology*. 2018;149(4):325-41.
10. 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.
11. Long F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;13(1):27-38.
12. Plotkin LI, Bellido T. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nature reviews Endocrinology*. 2016;12(10):593-605.
13. Sola-Ruiz MF, Perez-Martinez C, Labaig-Rueda C, Carda C, Martin De Llano JJ. Behavior of Human Osteoblast Cells Cultured on Titanium Discs in Relation to Surface Roughness and Presence of Melatonin. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4).
14. Nair AK, Gautieri A, Chang SW, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nature communications*. 2013;4:1724.
15. De Fusco C, Messina A, Monda V, Viggiano E, Moscatelli F. Osteopontin: Relation between Adipose Tissue and Bone Homeostasis. 2017;2017:4045238.
16. Salbach-Hirsch J, Ziegler N, Thiele S, Moeller S, Schnabelrauch M, Hintze V, et al. Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115(6):1101-11.
17. Wang Y, Azais T, Robin M, Vallee A, Catania C, Legriel P, et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature materials*. 2012;11(8):724-33.
18. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dymont NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2016;34(12):2930-42.
19. Yavropoulou MP, Yovos JG. The molecular basis of bone mechanotransduction. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2016;16(3):221-36.
20. Nandiraju D, Ahmed I. Human skeletal physiology and factors affecting its modeling and remodeling. *Fertility and Sterility*. 2019;112(5):775-81.

21. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018;185:240-75.
22. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. 2019;20(5):303-20.
23. Karampinos DC, Ruschke S. Quantitative MRI and spectroscopy of bone marrow. 2018;47(2):332-53.
24. Akiyama K, You YO, Yamaza T, Chen C, Tang L, Jin Y, et al. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem cell research & therapy*. 2012;3(5):40.
25. De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R, Fujiwara Y, Benvenisty N, Deng H, et al. Hallmarks of pluripotency. *Nature*. 2015;525(7570):469-78.
26. Daley GQ. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2015;370(1680):20140376.
27. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. 2019;13(9):1738-55.
28. Kusumbe AP, Adams RH. Osteoclast progenitors promote bone vascularization and osteogenesis. *Nature Medicine*. 2014;20(11):1238-40.
29. Duchamp de Lageneste O, Julien A, Abou-Khalil R, Frangi G, Carvalho C, Cagnard N, et al. Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. 2018;9(1):773.
30. Marín-Llera JC, Garcíadiego-Cázares D, Chimal-Monroy J. Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms That Control Early Cell Fate Decisions During Appendicular Skeletogenesis. *Frontiers in genetics*. 2019;10:977.
31. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell*. 2010;19(2):329-44.
32. Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis. *Current topics in developmental biology*. 2010;90:291-317.
33. Odgren PR, Witwicka H, Reyes-Gutierrez P. The cast of clasts: catabolism and vascular invasion during bone growth, repair, and disease by osteoclasts, chondroclasts, and septoclasts. *Connective tissue research*. 2016;57(3):161-74.
34. Yang L, Tsang KY, Tang HC, Chan D, Cheah KS. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(33):12097-102.
35. Aghajanian P, Mohan S. The art of building bone: emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification. *Bone research*. 2018;6:19.
36. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone*. 2015;80:14-8.
37. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. 2017;36(11):1461-73.
38. Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens, Greece)*. 2007;6(4):279-94.
39. Boyan BD, Olivares-Navarrete R, Berger MB, Hyzy SL, Schwartz Z. Role of Wnt11 during Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells on Microstructured Titanium Surfaces. *Scientific reports*. 2018;8(1):8588-.
40. Cannonier SA, Sterling JA. The Role of Hedgehog Signaling in Tumor Induced Bone Disease. *Cancers (Basel)*. 2015;7(3):1658-83.
41. Wu M, Chen G, Li YP. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone research*. 2016;4:16009.
42. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone research*. 2015;3:15005.
43. Jun JH, Yoon WJ, Seo SB, Woo KM, Kim GS, Ryoo HM, et al. BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(47):36410-9.

44. Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*. 2008;14(3):299-305.
45. Li G, Liu J, Wang Y, Yang K, Zhao M, Xiao Y, et al. LNGFR targets the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and promotes the osteogenic differentiation in rat ectomesenchymal stem cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):11021.
46. Zhang C, Hong F-F, Wang C-C, Li L, Chen J-L, Liu F, et al. TRIB3 inhibits proliferation and promotes osteogenesis in hBMSCs by regulating the ERK1/2 signaling pathway. *Scientific reports*. 2017;7(1):10342.
47. Zheng G, Xie Z, Wang P, Li J, Li M, Cen S, et al. Enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in ankylosing spondylitis: a study based on a three-dimensional biomimetic environment. *Cell Death & Disease*. 2019;10(5):350.
48. Hamidouche Z, Hay E, Vaudin P, Charbord P, Schule R, Marie PJ, et al. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-dependent Runx2 expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(11):3813-22.
49. Zhou H, Cooper MS, Seibel MJ. Endogenous Glucocorticoids and Bone. *Bone research*. 2013;1(2):107-19.
50. Walsh S, Jordan GR, Jefferiss C, Stewart K, Beresford JN. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2001;40(1):74-83.
51. Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1992;7(2):235-46.
52. Paciolla C, Fortunato S, Dipierro N, Paradiso A, De Leonardis S, Mastropasqua L, et al. Vitamin C in Plants: From Functions to Biofortification. 2019;8(11).
53. Abdullah M, Jamil RT, Attia FN. Vitamin C (Ascorbic Acid). *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
StatPearls Publishing LLC.; 2019.
54. Wang C, Cao X, Zhang Y. A novel bioactive osteogenesis scaffold delivers ascorbic acid, beta-glycerophosphate, and dexamethasone in vivo to promote bone regeneration. *Oncotarget*. 2017;8(19):31612-25.
55. Baker N, Sohn J, Tuan RS. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. *Stem cell research & therapy*. 2015;6:238.
56. Taylor SE, Shah M, Orriss IR. Generation of rodent and human osteoblasts. *BoneKey reports*. 2014;3:585.
57. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells, tissues, organs*. 2009;189(1-4):144-52.
58. Fatherazi S, Matsa-Dunn D, Foster BL, Rutherford RB, Somerman MJ, Presland RB. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *Journal of dental research*. 2009;88(1):39-44.
59. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8(3):133-43.
60. Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, Ferrari SL, et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nature Reviews Endocrinology*. 2017;13(4):208-19.
61. Fauny M, Albuissou E, Bauer E, Perrier-Cornet J, Chary-Valckenaere I, Loeuille D. Study of vertebral fracture and Scanographic Bone Attenuation Coefficient in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis vs. controls. *Scientific reports*. 2019;9(1):13323.
62. Masters EA, Trombetta RP, de Mesy Bentley KL, Boyce BF, Gill AL, Gill SR, et al. Evolving concepts in bone infection: redefining "biofilm", "acute vs. chronic osteomyelitis", "the immune proteome" and "local antibiotic therapy". *Bone research*. 2019;7(1):20.

63. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of dental research*. 2008;87(2):107-18.
64. Einhorn TA. The science of fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2005;19(10 Suppl):S4-6.
65. Zheng C, Qu YX, Wang B, Shen PF, Xu JD, Chen YX. COX-2/PGE2 facilitates fracture healing by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2019;23(22):9721-8.
66. Roberts SJ, Ke HZ. Anabolic Strategies to Augment Bone Fracture Healing. *Current osteoporosis reports*. 2018;16(3):289-98.
67. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, et al. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):427-34.
68. Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ. Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(6):1272-80.
69. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Current osteoporosis reports*. 2017;15(4):367-75.
70. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(9):1133-40.
71. Hinton RJ, Jing Y, Jing J, Feng JQ. Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *Journal of dental research*. 2017;96(1):23-30.
72. Wang Y, Chen L, Kang M, Ling L, Tian F, Won-Kim SH, et al. The Fracture Callus Is Formed by Progenitors of Different Skeletal Origins in a Site-Specific Manner. *JBMR plus*. 2019;3(9):e10193.
73. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):16069.
74. Morita M, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Watanabe R, Oike T, et al. Elevation of pro-inflammatory cytokine levels following anti-resorptive drug treatment is required for osteonecrosis development in infectious osteomyelitis. *Scientific reports*. 2017;7(1):46322.
75. Novais A, Lesieur J, Sadoine J, Slimani L, Baroukh B, Saubamea B, et al. Priming Dental Pulp Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth with Fibroblast Growth Factor-2 Enhances Mineralization Within Tissue-Engineered Constructs Implanted in Craniofacial Bone Defects. 2019;8(8):844-57.
76. DiGiovanni CW, Lin SS, Baumhauer JF, Daniels T, Younger A, Glazebrook M, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB and beta-tricalcium phosphate (rhPDGF-BB/beta-TCP): an alternative to autogenous bone graft. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013;95(13):1184-92.
77. Govender S, Csimma C, Genant HK, Valentin-Opran A, Amit Y, Arbel R, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84(12):2123-34.
78. Wojda SJ, Donahue SW. Parathyroid hormone for bone regeneration. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2018;36(10):2586-94.
79. Maeda K, Kobayashi Y. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. 2019;20(22).
80. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimple JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(3):140-50.
81. Grayson WL, Bunnell BA, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimple JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(3):140-50.

82. Ma L, Zhou Y, Zhu Y, Lin Z, Chen L, Zhang Y, et al. 3D printed personalized titanium plates improve clinical outcome in microwave ablation of bone tumors around the knee. *Scientific reports*. 2017;7(1):7626.
83. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2017;10(4).
84. Townsend JM, Sali G, Homburg HB, Cassidy NT, Sanders ME, Fung KM, et al. Thiolated Bone and Tendon Tissue Particles Covalently Bound in Hydrogels for In Vivo Calvarial Bone Regeneration. *Acta biomaterialia*. 2020.
85. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920.
86. Broughton KM, Sussman MA. Cardiac tissue engineering therapeutic products to enhance myocardial contractility. *Journal of muscle research and cell motility*. 2019.
87. Mase VJ, Jr., Hsu JR, Wolf SE, Wenke JC, Baer DG, Owens J, et al. Clinical application of an acellular biologic scaffold for surgical repair of a large, traumatic quadriceps femoris muscle defect. *Orthopedics*. 2010;33(7):511.
88. Roszbach BP, Gulecyuz MF, Kempfert L, Pietschmann MF, Ullmann T, Ficklscherer A, et al. Rotator Cuff Repair With Autologous Tenocytes and Biodegradable Collagen Scaffold: A Histological and Biomechanical Study in Sheep. *The American journal of sports medicine*. 2019:363546519892580.
89. Lyons LP, Hidalgo Perea S, Weinberg JB, Wittstein JR, McNulty AL. Meniscus-Derived Matrix Bioscaffolds: Effects of Concentration and Cross-Linking on Meniscus Cellular Responses and Tissue Repair. *International journal of molecular sciences*. 2019;21(1).
90. Rahyussalim AJ, Ivansyah MD, Nugroho A, Wikanjaya R, Canintika AF, Kurniawati T. Vertebral body defects treated with umbilical-cord mesenchymal stem cells combined with hydroxyapatite scaffolds: The first case report. *International journal of surgery case reports*. 2019;66:304-8.
91. Peck Y, He P, Chilla GSVN, Poh CL, Wang D-A. A preclinical evaluation of an autologous living hyaline-like cartilaginous graft for articular cartilage repair: a pilot study. *Scientific reports*. 2015;5(1):16225.
92. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(4):213-22.
93. Longoni A, Knežević L, Schepers K, Weinans H, Rosenberg AJWP, Gawlitta D. The impact of immune response on endochondral bone regeneration. *npj Regenerative Medicine*. 2018;3(1):22.
94. Acebal-Cortina G, Suárez-Suárez MA, García-Menéndez C, Moro-Barrero L, Iglesias-Colao R, Torres-Pérez A. Evaluation of autologous platelet concentrate for intertransverse lumbar fusion. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2011;20 Suppl 3(Suppl 3):361-6.
95. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2014;9(1):18.
96. Cheng TL, Leblanc E, Kalinina A, Cantrill LC, Valtchev P, Dehghani F, et al. A Bioactive Coating Enhances Bone Allografts in Rat Models of Bone Formation and Critical Defect Repair. 2019;37(11):2278-86.
97. Dhivya S, Saravanan S, Sastry TP, Selvamurugan N. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015;13(1):40.
98. Matsuno T, Hashimoto Y, Adachi S, Omata K, Yoshitaka Y, Ozeki Y, et al. Preparation of injectable 3D-formed beta-tricalcium phosphate bead/alginate composite for bone tissue engineering. *Dental materials journal*. 2008;27(6):827-34.
99. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2017;5:40.
100. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. *Bone research*. 2017;5:17014.

101. Saravanan S, Vimalraj S, Anuradha D. Chitosan based thermoresponsive hydrogel containing graphene oxide for bone tissue repair. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018;107:908-17.
102. Morais DS, Rodrigues MA, Silva TI, Lopes MA, Santos M, Santos JD, et al. Development and characterization of novel alginate-based hydrogels as vehicles for bone substitutes. *Carbohydrate polymers*. 2013;95(1):134-42.
103. Ma X, He Z, Han F, Zhong Z, Chen L, Li B. Preparation of collagen/hydroxyapatite/alendronate hybrid hydrogels as potential scaffolds for bone regeneration. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2016;143:81-7.
104. Chan EC, Kuo SM, Kong AM, Morrison WA, Dusting GJ, Mitchell GM, et al. Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. *PloS one*. 2016;11(2):e0149799.
105. Toosi S, Naderi-Meshkin H, Kalalinia F, HosseinKhani H, Heirani-Tabasi A, Havakhah S, et al. Bone defect healing is induced by collagen sponge/polyglycolic acid. 2019;30(3):33.
106. Liu Y, Gu J, Fan D. Fabrication of High-Strength and Porous Hybrid Scaffolds Based on Nano-Hydroxyapatite and Human-Like Collagen for Bone Tissue Regeneration. *Polymers*. 2020;12(1).
107. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in genetics : TIG*. 2004;20(1):33-43.
108. Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathologie-biologie*. 2005;53(7):430-42.
109. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*. 2005;70:301-39.
110. Marini JC, Forlino A, Bächinger HP, Bishop NJ, Byers PH, Paepe AD, et al. Osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17052.
111. Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(12):771-85.
112. Lang K, Schmid FX. Protein-disulphide isomerase and prolyl isomerase act differently and independently as catalysts of protein folding. *Nature*. 1988;331(6155):453-5.
113. Canty EG, Lu Y, Meadows RS, Shaw MK, Holmes DF, Kadler KE. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *The Journal of cell biology*. 2004;165(4):553-63.
114. Bekhouche M, Colige A. The procollagen N-proteinases ADAMTS2, 3 and 14 in pathophysiology. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2015;44-46:46-53.
115. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2007;26(7):508-23.
116. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):a004978-a.
117. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(12).
118. Komarova SV, Safranek L, Gopalakrishnan J, Ou M-JY, McKee MD, Murshed M, et al. Mathematical model for bone mineralization. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3:51-.
119. Lang SB, Tofail SA, Kholkin AL, Wojtas M, Gregor M, Gandhi AA, et al. Ferroelectric polarization in nanocrystalline hydroxyapatite thin films on silicon. *Scientific reports*. 2013;3:2215.
120. de Jong M, Chen W, Geerlings H, Asta M, Persson KA. A database to enable discovery and design of piezoelectric materials. *Scientific data*. 2015;2:150053.
121. Mohammadkhah M, Marinkovic D, Zehn M, Checa S. A review on computer modeling of bone piezoelectricity and its application to bone adaptation and regeneration. *Bone*. 2019;127:544-55.
122. Montalbano G, Borciani G, Pontremoli C, Ciapetti G. Development and Biocompatibility of Collagen-Based Composites Enriched with Nanoparticles of Strontium Containing Mesoporous Glass. 2019;12(22).

123. Yi H, Ur Rehman F, Zhao C, Liu B, He N. Recent advances in nano scaffolds for bone repair. *Bone research*. 2016;4:16050-.
124. Yao Q, Liu Y, Selvaratnam B, Koodali RT, Sun H. Mesoporous silicate nanoparticles/3D nanofibrous scaffold-mediated dual-drug delivery for bone tissue engineering. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2018;279:69-78.
125. Curtin CM, Tierney EG, McSorley K, Cryan SA, Duffy GP, O'Brien FJ. Combinatorial gene therapy accelerates bone regeneration: non-viral dual delivery of VEGF and BMP2 in a collagen-nanohydroxyapatite scaffold. *Advanced healthcare materials*. 2015;4(2):223-7.
126. Lee CS, Bishop ES, Dumanian Z, Zhao C, Song D, Zhang F, et al. Bone Morphogenetic Protein-9-Stimulated Adipocyte-Derived Mesenchymal Progenitors Entrapped in a Thermoresponsive Nanocomposite Scaffold Facilitate Cranial Defect Repair. *The Journal of craniofacial surgery*. 2019;30(6):1915-9.
127. Li M, Liu J, Cui X, Sun G, Hu J, Xu S, et al. Osteogenesis effects of magnetic nanoparticles modified-porous scaffolds for the reconstruction of bone defect after bone tumor resection. *Regen Biomater*. 2019;6(6):373-81.
128. Zhuang J, Lin S, Dong L, Cheng K, Weng W. Magnetically actuated mechanical stimuli on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/mineralized collagen coatings to enhance osteogenic differentiation of the MC3T3-E1 cells. *Acta biomaterialia*. 2018;71:49-60.
129. Tandon B, Blaker JJ, Cartmell SH. Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair. *Acta biomaterialia*. 2018;73:1-20.
130. Li Y, Dai X, Bai Y, Liu Y, Wang Y, Liu O, et al. Electroactive BaTiO<sub>3</sub> nanoparticle-functionalized fibrous scaffolds enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International journal of nanomedicine*. 2017;12:4007-18.
131. Baxter FR, Bowen CR, Turner IG, Dent AC. Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses. *Annals of biomedical engineering*. 2010;38(6):2079-92.
132. Nelson RL, Griffin BG, Brown DP, McKeown S, Stenger V, editors. Barium Titanate Electro-Optic Modulators. 2019 IEEE Avionics and Vehicle Fiber-Optics and Photonics Conference (AVFOP); 2019 5-6 Nov. 2019.
133. Aksel E, Jones JL. Advances in lead-free piezoelectric materials for sensors and actuators. *Sensors (Basel)*. 2010;10(3):1935-54.
134. Mason WP, Wick RF. A Barium Titanate Transducer Capable of Large Motion at an Ultrasonic Frequency. *The Journal of the Acoustical Society of America*. 1951;23(2):209-14.
135. Kuga Y, Ogawara R, Ishikawa M. Feasibility study on a novel tiny dosimeter using a barium titanate capacitor. *Journal of radiation research*. 2019.
136. Kwei GH, Lawson AC, Billinge SJL, Cheong SW. Structures of the ferroelectric phases of barium titanate. *The Journal of Physical Chemistry*. 1993;97(10):2368-77.
137. Hoffmann M, Ravindran PV, Khan AI. Why Do Ferroelectrics Exhibit Negative Capacitance? *Materials (Basel, Switzerland)*. 2019;12(22).
138. Jiang B, Iocozzia J, Zhao L, Zhang H, Harn Y-W, Chen Y, et al. Barium titanate at the nanoscale: controlled synthesis and dielectric and ferroelectric properties. *Chemical Society Reviews*. 2019;48(4):1194-228.
139. Ball JP, Mound BA, Nino JC, Allen JB. Biocompatible evaluation of barium titanate foamed ceramic structures for orthopedic applications. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014;102(7):2089-95.
140. Ciofani G, Ricotti L, Canale C, D'Alessandro D, Berrettini S, Mazzolai B, et al. Effects of barium titanate nanoparticles on proliferation and differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2013;102:312-20.
141. Shokrollahi H, Salimi F, Doostmohammadi A. The fabrication and characterization of barium titanate/akermanite nano-bio-ceramic with a suitable piezoelectric coefficient for bone defect recovery. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2017;74:365-70.
142. Tang Y, Wu C, Wu Z, Hu L, Zhang W, Zhao K. Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration. *Scientific reports*. 2017;7:43360.

143. Zhang K, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X, et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone research*. 2018;6(1):31.
144. Schmidt MM, Dornelles RCP, Mello R, Kubota EH, Mazutti M, Kempka A, et al. Collagen extraction process. 2016;23:913-22.
145. Rajan N, Habermehl J, Coté M-F, 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.
146. Wang W, Li F, Wang K, Cheng B, Guo X. PAPSS2 promotes alkaline phosphates activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells by crosstalk and Smads signal pathways. *PloS one*. 2012;7(8):e43475-e.
147. Reis AMS, Ribeiro LGR, Ocarino NdM, Goes AM, Serakides R. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015;16(1):10-.
148. Chiarella E, Aloisio A, Scicchitano S, Lucchino V, Montalcini Y, Galasso O, et al. ZNF521 Represses Osteoblastic Differentiation in Human Adipose-Derived Stem Cells. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(12):4095.
149. Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Pellegrini C, Blandizzi C, Dolfi A, et al. Histochemical Detection of Collagen Fibers by Sirius Red/Fast Green Is More Sensitive than van Gieson or Sirius Red Alone in Normal and Inflamed Rat Colon. *PloS one*. 2015;10(12):e0144630.
150. Thornton B, Basu C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2011;39(2):145-54.
151. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012;13:134.
152. Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2007;22(5):1304-9.
153. Veronick J, Assanah F, Nair LS, Vyas V, Huey B, Khan Y. The effect of acoustic radiation force on osteoblasts in cell/hydrogel constructs for bone repair. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(10):1149-56.
154. Xie YF, Shi WG, Zhou J, Gao YH, Wang MG, Chen KM. [3D Collagen Hydrogel Culture of Rat Calvarial Osteoblasts]. *Sichuan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Sichuan University Medical science edition*. 2016;47(2):164-8.
155. Jain KG, Mohanty S, Ray AR, Malhotra R, Airan B. Culture & differentiation of mesenchymal stem cell into osteoblast on degradable biomedical composite scaffold: In vitro study. *Indian J Med Res*. 2015;142(6):747-58.
156. Chu L, Yang Y, Yang S, Fan Q, Yu Z, Hu X-L, et al. Preferential Colonization of Osteoblasts Over Co-cultured Bacteria on a Bifunctional Biomaterial Surface. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9(2219).
157. Amaral DL, Zanette RS, Almeida CG, Almeida LB, Oliveira LF, Marcomini RF, et al. In vitro evaluation of barium titanate nanoparticle/alginate 3D scaffold for osteogenic human stem cell differentiation. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 2019;14(3):035011.
158. Uhl AM, Andrew JS. Sol-Gel Based Electrospray Synthesis of Barium Titanate Nanoparticles. *IEEE transactions on nanobioscience*. 2020.
159. Niederberger M, Garnweitner G, Pinna N, Antonietti M. Nonaqueous and halide-free route to crystalline BaTiO<sub>3</sub>, SrTiO<sub>3</sub>, and (Ba,Sr)TiO<sub>3</sub> nanoparticles via a mechanism involving C-C bond formation. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(29):9120-6.
160. Qi JQ, Peng T, Hu YM, Sun L, Wang Y, Chen WP, et al. Direct synthesis of ultrafine tetragonal BaTiO<sub>3</sub> nanoparticles at room temperature. *Nanoscale research letters*. 2011;6(1):466.
161. Huan Y, Wang X, Fang J, Li L. Grain size effect on piezoelectric and ferroelectric properties of BaTiO<sub>3</sub> ceramics. *Journal of the European Ceramic Society*. 2014;34(5):1445-8.
162. Du B, Yu M, Zheng J. Transport and interactions of nanoparticles in the kidneys. *Nature Reviews Materials*. 2018;3(10):358-74.

163. Jiang Q, Ning H, Zhang Q, Cain M, Reece M, Yan H. Active ferroelectricity in nanostructured multiferroic BiFeO<sub>3</sub> bulk ceramics. *Journal of Materials Chemistry*. 2013;1.
164. Metwally S, Stachewicz U. Surface potential and charges impact on cell responses on biomaterials interfaces for medical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;104:109883.
165. Ohgaki M, Kizuki T, Katsura M, Yamashita K. Manipulation of selective cell adhesion and growth by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;57(3):366-73.
166. Bursill LA, Lin PJ. Microdomains observed at the ferroelectric/paraelectric phase transition of barium titanate. *Nature*. 1984;311(5986):550-2.
167. Sidorkin AS, Nesterenko LP, Gagou Y, Saint-Gregoire P, Vorotnikov EV, Pakhomov AY, et al. Repolarization of Ferroelectric Superlattices BaZrO<sub>3</sub>/BaTiO<sub>3</sub>. *Scientific reports*. 2019;9(1):18948.
168. Sameera Devi C, Kumar GS, Prasad G. Spectroscopic and electrical studies on Nd(3+), Zr(4+) ions doped nano-sized BaTiO<sub>3</sub> ferroelectrics prepared by sol-gel method. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2015;136 Pt B:366-72.
169. Chávez E, Fuentes S, Zarate RA, Padilla-Campos L. Structural analysis of nanocrystalline BaTiO<sub>3</sub>. *Journal of Molecular Structure*. 2010;984(1):131-6.
170. Jelinek M, Buixaderas E, Drahoukoupil J, Kocourek T, Remsa J, Vanek P, et al. Laser-synthesized nanocrystalline, ferroelectric, bioactive BaTiO<sub>3</sub>/Pt/FS for bone implants. *Journal of biomaterials applications*. 2018;32(10):1464-75.
171. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomedical engineering online*. 2019;18(1):24.
172. Ju H, Liu X, Zhang G, Liu D, Yang Y. Comparison of the Structural Characteristics of Native Collagen Fibrils Derived from Bovine Tendons using Two Different Methods: Modified Acid-Solubilized and Pepsin-Aided Extraction. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2020;13(2).
173. Capella-Monsonís H, Coentro JQ, Graceffa V, Wu Z, Zeugolis DI. An experimental toolbox for characterization of mammalian collagen type I in biological specimens. *Nature Protocols*. 2018;13(3):507-29.
174. Vidal A, Duarte L, Schmidt M, Cansian R, Fernandes I, Mello R, et al. Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-products. *Waste management (New York, NY)*. 2019;102:838-46.
175. De Aro AA, Ferrucci DL, Borges FP, Stach-Machado DR, Macedo DV, Pimentel ER. Exhaustive exercise with different rest periods changes the collagen content and MMP-2 activation on the calcaneal tendon. *Anatomical record (Hoboken, NJ : 2007)*. 2014;297(2):281-8.
176. Bergholt MS, Serio A, Albro MB. Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2019;7:303.
177. Albro MB, Bergholt MS, St-Pierre JP, Vinals Guitart A, Zlotnick HM, Evita EG, et al. Raman spectroscopic imaging for quantification of depth-dependent and local heterogeneities in native and engineered cartilage. *npj Regenerative Medicine*. 2018;3(1):3.
178. Gąsior-Głogowska M, Komorowska M, Hanuza J, Ptak M, Kobielarz M. Structural alteration of collagen fibres - spectroscopic and mechanical studies. *Acta of bioengineering and biomechanics / Wrocław University of Technology*. 2010;12:55-62.
179. Janko M, Davydovskaya P, Bauer M, Zink A, Stark R. Anisotropic Raman scattering in collagen bundles. *Optics letters*. 2010;35:2765-7.
180. Lim NS, Hamed Z, Yeow CH, Chan C, Huang Z. Early detection of biomolecular changes in disrupted porcine cartilage using polarized Raman spectroscopy. *Journal of biomedical optics*. 2011;16(1):017003.
181. Gullekson C, Lucas L, Hewitt K, Kreplak L. Surface-sensitive Raman spectroscopy of collagen I fibrils. *Biophys J*. 2011;100(7):1837-45.
182. Carcamo JJ, Aliaga AE, Clavijo RE, Branes MR, Campos-Vallette MM. Raman study of the shockwave effect on collagens. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2012;86:360-5.

183. Nocera AD, Comin R, Salvatierra NA, Cid MP. Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical microdevices*. 2018;20(2):26.
184. Kim WJ, Yun H-S, Kim GH. An innovative cell-laden  $\alpha$ -TCP/collagen scaffold fabricated using a two-step printing process for potential application in regenerating hard tissues. *Scientific reports*. 2017;7(1):3181.
185. Calabrese G, Giuffrida R, Fabbi C, Figallo E, Lo Furno D, Gulino R, et al. Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds Induce Human Adipose Derived Stem Cells Osteogenic Differentiation In Vitro. *PloS one*. 2016;11(3):e0151181-e.
186. Zanzfir AV, Voicu G, Busuioc C, Jinga SI, Albu MG, Iordache F. New Coll-HA/BT composite materials for hard tissue engineering. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2016;62:795-805.
187. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):117.
188. Gutiérrez-Prieto S, Perdomo S, Diaz-Peraza J, Sequeda-Castañeda L. Analysis of In Vitro Osteoblast Culture on Scaffolds for Future Bone Regeneration Purposes in Dentistry. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2019;2019:9.
189. Tieliewuhan Y, Hirata I, Sasaki A, Minagi H, Okazaki M. Osteoblast proliferation behavior and bone formation on and in CO<sub>3</sub>apatite-collagen sponges with a porous hydroxyapatite frame. *Dental materials journal*. 2004;23(3):258-64.
190. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):448-52.
191. DeFranco DJ, Glowacki J, Cox KA, Lian JB. Normal bone particles are preferentially resorbed in the presence of osteocalcin-deficient bone particles *In vivo*. *Calcified tissue international*. 1991;49(1):43-50.
192. Carvalho MS, Poundarik AA, Cabral JMS, da Silva CL, Vashishth D. Biomimetic matrices for rapidly forming mineralized bone tissue based on stem cell-mediated osteogenesis. *Scientific reports*. 2018;8(1):14388.

## 9 ANEXO




---

 Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSJ - CEUA/UFSJ
 

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Desenvolvimento biotecnológico de scaffolds de baixo custo para reparo ósseo”, protocolo nº 009/2018 sob a responsabilidade de Erika Lorena Fonseca Costa de Alvarenga que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de São João del-Rei, em reunião de 17/08/18.

Finalidade	( ) Ensino	( x ) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 17/08/18	Término: 01/06/23
Espécie/Linhagem /raça	180 Rato heterogênico - <i>Rattus norvegicus albinus</i> e 360 neonatos oriundos do descarte realizado pelo NUCAL.	
Nº de animais	540	
Peso / Idade	350-500 gramas / 12 semanas ; 10 - 20 g / 3 - 5 dias	
Sexo	180 Machos adultos; 180 machos neonatos; 180 femeas neonatos.	
Origem	Biotério Central da UFSJ Campus Tancredo Neves - CTAN São João del Rei - MG	

**Prof.ª Liliam Midori Ide**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA-UFSJ