

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

CIBELE BONICELLI GAMBAROTTO

AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO EM
SCAFFOLDS DE ÁCIDO POLILÁCTICO OBTIDOS POR
IMPRESSÃO 3D NA ADSORÇÃO DA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA 2 RECOMBINANTE HUMANA E OS
EFEITOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E MINERALIZAÇÃO
ÓSSEA *IN VITRO*

Araraquara, SP

2021

CIBELE BONICELLI GAMBAROTTO

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO EM
SCAFFOLDS DE ÁCIDO POLILÁCTICO OBTIDOS POR
IMPRESSÃO 3D NA ADSORÇÃO DA PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA 2 RECOMBINANTE HUMANA E OS
EFEITOS NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E MINERALIZAÇÃO
ÓSSEA *IN VITRO***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Mônica Rosas da Costa lemma

Araraquara, SP

2021

G179a Gambarotto, Cibele Bonicelli

Avaliação do tratamento com hidróxido de sódio em scaffolds de ácido poliláctico obtidos por impressão 3D na absorção da proteína morfogenética óssea 2 recombinante humana e os efeitos na proliferação celular e mineralização óssea in vitro/Cibele Bonicelli Gambarotto. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2021.
69f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Profa. Mônica Rosas da Costa Iemma

1. Osteoblastos. 2. Ácido poliláctico. 3. Proteína morfogenética óssea.
I. Título.

CDU 57.089

CIBELE BONICELLI GAMBAROTTO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 20 de abril de 2021.

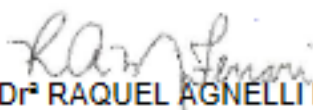
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª Drª RAQUEL AGNELLI MESQUITA FERRARI
Universidade Nove de Julho - UNINOVE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

Agradecimentos

Primeiramente à Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes 2 anos de mestrado, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

À minha família que sempre me fez entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Ao meu amor e companheiro, João, por toda a paciência e carinho em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos e companheiros de trabalho pelos incríveis momentos de descontração e auxílio.

À minha orientadora, Dra. Mônica Rosas Da Costa lemma por estar ao meu lado, me guiando e fornecendo todo o apoio e conhecimento possível. Obrigada pelo carinho, dedicação e orientação.

À prof.^a Dra. Marisa Narciso Fernandes e ao laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) por toda colaboração.

Ao MSc. Igor Tadeu Silva Batista do laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) pela impressão 3D do polímero em estudo.

À MSc. Amanda Claro do laboratório de Biopolímeros e Biomateriais (BioPolMat) pela colaboração na correção dos gráficos do FTIR

À Prof.^a Dra. Sandra Andrea Cruz e seu aluno Iago Malvestio de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, pelas caracterizações do polímero em estudo.

À Dra. Bianca Martins Estevão do grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia da Universidade de São Paulo pela colaboração nas análises de AFM e FTIR.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Hernane da Silva Barud (PPGB-UNIARA) e Prof.^a Dra.^a Raquel Agnelli Mesquita (UNINOVE) por ter cedido parte de seus preciosos tempos para estar aqui hoje. Obrigada pelas considerações.

À CAPES pelo apoio e concessão da taxa escolar.

RESUMO

A engenharia de tecidos tornou-se uma estratégia promissora para o reparo tecidual, entre eles a cartilagem danificada ou tecido ósseo. Entre os biomateriais que vem sendo amplamente estudados na área de reparo tecidual, encontra-se o polímero de ácido poliláctico (PLA). Contudo o PLA apresenta uma baixa hidrofiliabilidade, dificultando o processo de adsorção de fatores biológicos, por isso, são comumente submetidas as modificações de superfícies por diferentes técnicas, sendo uma delas a modificação química por tratamento com NaOH. As proteínas ósseas morfogenéticas “BMPs” são um grupo de citocinas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea. Estudos, *in vivo* e *in vitro*, na Medicina Regenerativa tem avaliado uso das BMPs associadas a diferentes materiais, como carreadores, para melhorar a função do reparo ósseo. O objetivo deste projeto foi estabelecer as condições de funcionalização dos *scaffolds* de PLA impressos 3D, quimicamente modificados com NaOH e funcionalizados com a rhBMP-2 (proteína morfogenética óssea humana recombinante 2), analisando a proliferação e síntese de matriz óssea de células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1) cultivadas na presença desses *scaffolds*. Para isso foram analisadas a detecção de mineralização óssea pela coloração com o vermelho de alizarina e ensaio de viabilidade celular por detecção da atividade mitocondrial por meio da redução do reagente resazurina, além da caracterização físico-química do PLA. A modificação química do *scaffold* de PLA foi comprovada pela inserção de novos grupos químicos e aumento da rugosidade do biopolímero. Os resultados também demonstraram que o tratamento químico não alterou a viabilidade e proliferação das células MC3T3-E1. Houve maior adsorção da rhBMP-2 no PLA tratado com 0,25M de NaOH, entretanto o ensaio de síntese de matriz óssea mostrou que a rhBMP-2 teve melhor função biológica no *scaffold* sem tratamento químico.

Palavras-chave: osteoblastos, ácido poliláctico, proteína morfogenética óssea

ABSTRACT

Tissue engineering has become a promising strategy for tissue repair, including damaged cartilage or bone tissue. Among the biomaterials that have been widely studied in tissue repair, there is the polylactic acid polymer (PLA). However, PLA has a low hydrophilicity, making the adsorption process of biological factors difficult, which is why they are commonly subjected to surface modifications by different techniques, one of which is chemical modification by treatment with NaOH. Bone morphogenetic proteins "BMPs" are a group of cytokines responsible for recruiting osteoprogenitor cells to bone formation sites. Studies, in vivo and in vitro, in Regenerative Medicine have evaluated the use of BMPs associated with different materials, such as carriers, to improve the function of bone repair. The objective of this project was to establish the functionalization conditions of the 3D printed PLA *scaffolds*, chemically modified with NaOH and functionalized with rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein 2), analyzing the proliferation and synthesis of bone matrix of pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1) grown in the presence of these *scaffolds*. For this purpose, the detection of bone mineralization by staining with alizarin red and cell viability assay by detecting mitochondrial activity by reducing the resazurin reagent, in addition to the physical-chemical characterization of PLA, were analyzed. The chemical modification of the PLA scaffold was proven by the insertion of new chemical groups and an increase in the roughness of the biopolymer. The results also demonstrated that the chemical treatment did not alter the viability and proliferation of the MC3T3-E1 cells. There was greater adsorption of rhBMP-2 in the PLA treated with 0.25M NaOH, however the bone matrix synthesis assay showed that rhBMP-2 had better biological function in the scaffold without chemical treatment.

Keywords: osteoblasts, polylactic acid, bone morphogenetic protein

LISTA DE ABREVIações

3D	Tridimensional
2D	bidimensional
MA	Manufatura Aditiva
MJM	Modelagem Multijet
BJ	<i>Binder Jetting</i>
WDM	Modelagem de Deposição de Cera
LIFT	Transferência Direta Induzida por <i>Laser</i>
DIW	Escrita Direta com Tinta
FDM	Modelagem de Deposição Fundida
SSL	Sintetização Seletiva a Laser
SDLM	Sintetização Direta a Laser de Metal
FSL	Fusão Seletiva a Laser
FFE	Fusão por feixe de elétrons
PLA	Poli (ácido láctico)
PGA	Poli (ácido glicólico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PCL	Policaprolactona
$\text{HO} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}$	Ácido láctico
HCL	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
COOH	Ácido carboxílico

OH	Composto Hidroxila
PDLA	Poli (D-ácido láctico)
PLLA	Poli (L-ácido láctico)
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
rh-BMP2	Proteína Morfogenética Óssea Recombinante 2
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador- β
PGRN	Progranulina
GDF	Fator de Diferenciação de Crescimento
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
PTH	Hormônio da Paratireóide
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
MC3T3-E1	Células Pré-Osteoblásticas de rato
AFM	Microscopia de força atômica
FTIR-ATR de Reflectância Total Atenuada)	Infravermelho com Transformada de Fourier

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem ilustrativa de uma impressora FDM.

Figura 2- Estrutura do monômero do PLA.

Figura 3- Tríade da Medicina Regenerativa.

Figura 4- Corte transversal de um osso demonstrando sua estrutura interna. O osso compacto denso externo (também chamado de osso cortical) e o osso interno esponjoso preenchido com espículas (trabecular).

Figura 5- Células do tecido ósseo.

Figura 6- *Scaffold* de polímero PLA em comparação com moeda.

Figura 7- Células MC3T3-E1 semiconfluentes, em meio de cultivo α - MEM suplementado com 10% de SFB. Aumento de 40X

Figura 8- Tratamento dos *scaffolds* de PLA em soluções de NaOH em diferentes concentrações. O espectro compara esses diferentes tratamentos com o polímero não tratado (w/o).

Figura 9- Modificações da superfície do polímero tratado com diferentes concentrações de NaOH.

Figura 10- Viabilidade de células MC3T3-E1 cultivadas sobre *scaffolds* de PLA tratados com diferentes concentrações de NaOH, em diferentes dias (1,3,5,7,9,11 e 15).

Figura 11- Ensaio de síntese de matriz óssea. *Scaffolds* de cima representados pela associação da modificação com NaOH e adsorção com a rhBM-2 em meio privado de soro. *Scaffolds* de baixo tratados quimicamente com NaOH em meio de diferenciação (α -MEM suplementado com 10% SFB, 10 mM de β -glicofosfato, 01 mM de dexametasona e 50 mM de ácido ascórbico).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As gerações dos biomateriais.

Tabela 2: Valores de adsorção da rhBMP-2 em *scaffolds* de PLA. *RhBMP-2 parcialmente purificada com concentração inicial de 0,825 mg/ml.

Sumário

1. Introdução	14
2. Revisão Bibliográfica	17
2.1. Manufatura Aditiva (MA)	17
2.2. Biomateriais e biopolímeros.....	20
2.3. Poli (Ácido Lático) – (PLA)	22
2.4. Modificação de superfície do PLA.....	24
2.5. Medicina Regenerativa	26
2.7. Células ósseas	30
2.8. Remodelamento ósseo.....	31
2.9. Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)	32
3. Hipótese	36
4. Objetivos	37
4.1. Objetivo geral	37
4.2. Objetivos específicos.....	37
5. Metodologia:	38
5.1. Obtenção dos <i>scaffolds</i> de PLA.....	39
5.2. Tratamento dos <i>scaffolds</i> com NaOH	40
5.3. Esterilização dos <i>scaffolds</i> de PLA para cultivo celular.....	40
5.4. Cultivo celular	40
5.5. Avaliação da adesão e proliferação celular por meio do reagente resazurina	41
5.6. Adsorção da rhBMP-2	42
5.7. Ensaio de síntese de matriz óssea por meio do método colorimétrico com vermelho de Alizarina.....	42
5.8. Caracterização dos suportes de PLA	43
5.8.1. FTIR-ATR	43
5.8.2. Microscopia de força atômica (AFM)	44
6. Resultados e Discussão	45
6.1. FTIR-ATR.....	45
6.2. AFM.....	47
6.3. Ensaio de proliferação e viabilidade celular	49
6.4. Adsorção da rhBMP-2	51
6.5. Ensaio de síntese de matriz óssea por meio do método colorimétrico com vermelho de Alizarina.....	52
7. Conclusões.....	56
Referências bibliográficas	57

1. Introdução

A Manufatura Aditiva (MA) vem desempenhando papel importante na prototipagem de dispositivos biomédicos complexos. Desde seu uso inicial como modelos de visualização pré-cirúrgicos e moldes de ferramentas, a manufatura aditiva tem evoluído para criar dispositivos únicos e implantes além de *scaffolds* para engenharia de tecidos (LIAW; GUVENDIREN, 2017).

Os biomateriais podem fornecer uma matriz osteocondutora guiando a formação de tecido ósseo no interior do defeito ou da área enxertada (SLAUGHTER et al., 2009). Melhorar as propriedades osteocondutoras dos biomateriais é de extrema importância e por essa razão, muitas vezes são suplementados com fatores de crescimento como a rhBMP-2, para aprimorar o processo de formação óssea e, assim, a consolidação do biomaterial (ROBBS et al., 2014).

Os biopolímeros bioreabsorvíveis são materiais interessantes para utilização como implantes temporários, como o Poli (ácido láctico) – PLA. Estes apresentam vantagens em relação aos materiais não degradáveis, pois são produzidos a partir de fontes renováveis, apresentam alta biocompatibilidade e pelo fato de serem bioreabsorvíveis não necessitam de procedimentos cirúrgicos para sua retirada, sendo degradado pelo próprio organismo (MOTTA; DUEK, 2009; GIRONES MOLERA; ALBERTO MENDEZ; SAN ROMAN, 2012).

Entretanto alguns desses materiais apresentam baixa hidrofiliabilidade, dificultando o processo de adsorção de fatores biológicos que estão relacionados

ao processo de adesão, espreadimento e migração celular (PLACE et al., 2009). Para evitar esse problema, os polímeros são comumente submetidos a técnicas de modificação de superfície (MA; MAO; GAO, 2007; ROACH et al., 2007).

Existem vários estudos sobre o tratamento de superfície e modificação de superfícies de PLA. No entanto, muitos métodos existentes são caros, demorados e às vezes difíceis de realizar (MOHD SABEE et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2020).

O hidróxido de sódio além de ser barato e adquirido com facilidade, sua reação de hidrólise na presença do PLA é fácil de realizar. Várias pesquisas vêm demonstrando os efeitos deste tratamento nas superfícies deste biopolímero (MOHD SABEE et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2020; WANG; CUI; BEI, 2005).

As Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) são provavelmente os fatores de crescimento mais estudados na formação óssea e mais eficientes no reparo de lesões ósseas (KHOJASTEH et al., 2013; XIAO; XIANG; SHAO, 2007). Apesar de induzirem formação óssea quando implantadas sozinhas, as BMPs associadas com outros substratos ou meios, se torna mais eficiente (FU et al., 2017; SHUANG et al., 2016).

Dados preliminares do grupo de pesquisa obtidos por Reina (2018) mostraram a influência positiva da modificação química do NaOH na adesão celular sendo testada apenas na concentração de 0,1M. No entanto para a adsorção (interação por carga) da rhBMP-2 não foi comprovada eficácia nessas condições.

A engenharia de tecidos, portanto, tornou-se uma estratégia promissora para reconstrução e regeneração de cartilagem e tecido ósseo, combinando

células, biomaterial como *scaffolds* e fatores de crescimento necessários para melhorar ou substituir funções biológicas (LIU et al., 2017).

Para reconstruir totalmente a cartilagem e tecido ósseo, é necessário sintetizar *scaffolds* biodegradáveis e biocompatíveis com o tecido específico (MALDA et al., 2013). A interação células-biomateriais é de fundamental importância, pois influencia os processos biológicos como diferenciação e proliferação celular (WANG; SHANG; LI, 2015). Além disso, o processo de adesão celular é um importante requerimento para o sucesso do implante (BALAKRISHNAN; BANERJEE, 2011).

Entretanto, nenhum trabalho foi publicado ainda, associando a modificação química do polímero PLA e a funcionalização dele com a rhBMP-2.

Neste trabalho foi feita a modificação química de superfície do PLA tratado com diferentes concentrações de NaOH (0,25; 0,5 e 1 M) com mesmo tempo de tratamento, para avaliar as condições da rhBMP-2 e a indução da mineralização em cultivo celular na presença destes *scaffolds*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Manufatura Aditiva (MA)

Nas últimas décadas, a tecnologia de impressão avançou significativamente. A impressão bidimensional (2D) passou por um processo de manufatura aditiva (MA), no qual camadas sucessivas de material são distribuídas para formar estruturas 3D (MURPHY; ATALA, 2014; ZHU et al., 2016). E foi na década de 80 que a impressão 3D começou a ser propagada, tornando-se um dos métodos mais eficientes para fabricar produtos personalizados usando uma variedade de materiais como o plástico, cerâmica, madeira e metal (RAYNA; STRIUKOVA, 2016).

Embora a tecnologia 3D tenha sido originalmente destinada a utilização industrial, a diminuição constante de custos sob ela, fez com que estivesse ao alcance de pequenas e médias empresas. Por exemplo, uma impressora de modelagem de deposição fundida (FDM) custa hoje, menos de US\$ 1.000 em comparação com US\$ 10.000 no ano de 2009, quando a patente FDM foi expirada (RAYNA; STRIUKOVA, 2016; LIAW; GUVENDIREN, 2017).

Conforme o Relatório Wohlers (empresa atuante na pesquisa de mercado de impressoras 3D) a indústria de MA, incluindo serviços e produtos em todo o mundo, cresceu 26,2% nos últimos 27 anos para US \$ 5,1 bilhões em 2015. O setor de saúde é o terceiro maior mercado, com aproximadamente 16% da receita geral, seguindo a linha automotiva e de eletrônicos.

Além das aplicações nos setores de manufatura e consumo, a impressão 3D está transformando a ciência. Pesquisas na área médica vem utilizando essa impressão no desenvolvimento de tecidos artificiais, dispositivos médicos, implantes ortodônticos, medicamentos entre outros (FLÜGGE et al., 2013; LIAW; GUVENDIREN, 2017; MALONE; LIPSON, 2007; RODRIGUES et al., 2018). Além dos modelos anatômicos que auxiliam no planejamento pré-cirúrgico e na educação (KURENOV et al., 2015).

Para entender melhor as aplicações atuais e os potenciais da tecnologia 3D na medicina, é imprescindível conhecer os tipos de impressão e materiais empregados. As tecnologias MA podem ser classificadas em quatro grupos principais: impressão baseada em polimerização em cubas, impressão baseada em pó, impressão baseada em gotículas e impressão baseada em extrusão (LIAW; GUVENDIREN, 2017).

Na impressão de polimerização em cuba, as estruturas impressas são geralmente expostas à luz pós-impressão para aumentar a estabilidade e as propriedades mecânicas, sendo geralmente aplicada na odontologia (D'HAESE et al., 2012). As duas formas mais comuns desse tipo de polimerização são SLA (Estereolitografia) e PLD (Processamento de luz digital).

Todas as tecnologias de impressão à base de pó dependem de aquecimento localizado para fundir os materiais em pó, mas diferem na fonte de energia e nos materiais (WONG; HERNANDEZ, 2012). Tem sido utilizadas na odontologia há cerca de 10 anos, e utilizam ligas metálicas biocompatíveis, como titânio e ligas de aço inoxidável na fabricação de pontes, implantes e estruturas de próteses parciais (TRAINI et al., 2008; AVERYANOVA; BERTRAND; VERQUIN, 2011). As formas mais comuns dessa impressão incluem a

Sinterização Seletiva a Laser (SSL), Sinterização direta a Laser de Metal (SDLM), Fusão Seletiva a Laser (FSL) e Fusão por Feixe de Elétrons (FFE).

A impressão baseada em gotículas, utiliza o jato preciso de gotículas de líquido em um substrato camada por camada. As tecnologias baseadas em gotículas incluem modelagem multijet (MJM) e binder jetting (BJ) (STEVE UPCRAFT; RICHARD FLETCHER, 2003), modelagem de deposição de cera (WDM) (DO et al., 2015) e transferência direta induzida por laser (LIFT) (OZBOLAT, 2015). O LIFT foi inicialmente usado com metais, também aplicado a hidrogéis carregados de células (MALDA et al., 2013).

As tecnologias baseadas em extrusão incluem a escrita direta com tinta (DIW), também conhecida como bioplotter (LEWIS, 2006) que utiliza um sistema de distribuição pneumático ou mecânico para extrusão de soluções, géis ou materiais fundidos através de um bico ou seringa. E a modelagem de deposição fundida (FDM) (**Fig. 1**) (WONG; HERNANDEZ, 2012) utilizada nesse trabalho. Emprega filamentos termoplásticos ou compostos, que são extrudados através de um bico quente. A FDM apresenta algumas vantagens como a rápida obtenção de suportes com estruturas complexas além da redução do planejamento de produção (CHIA; WU, 2015).

Figura 1- Imagem ilustrativa de uma impressora FDM



Fonte: ALL3DP

2.2. Biomateriais e biopolímeros

Os biomateriais são definidos como qualquer material que entram em contato com sistemas biológicos, a fim de realizar a função pretendida podendo atuar como suporte para as células. Podem ser feitos de diferentes tipos de materiais, incluindo metais, cerâmicas, compósitos, hidrogéis e polímeros (KULINETTS, 2015).

O desenvolvimento desses materiais tem vivenciado três gerações específicas (**Tabela 1**). Inicialmente, os biomateriais eram aplicados de forma que o tecido em reparação não sofresse prejuízo na presença do material

hospedeiro. Com o passar do tempo, buscou-se materiais mais complexos com superfícies bioativas que poderiam se ligar com o tecido adjacente representados por ligas de titânio, hidroxiapatita e fosfatos de cálcio. Recentemente, o enfoque da 3ª geração é buscar um material com estrutura temporária, que permite a degradação e integração do tecido nativo com o implante e eventualmente, substituí-lo pós-degradação. Esses biomateriais degradáveis compreendem as ligas de magnésio, biovidro degradável e polímeros degradáveis (HOLZAPFEL et al., 2013; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Tabela 1. As gerações dos biomateriais

Geração	Bioatividade	Vantagens clínicas	Exemplos
Primeira	Biologicamente inerte	Sem prejuízo aos tecidos	Ligas a base de Co Al ₂ O ₃ Poliuretano
Segunda	Erosão superficial	Integração tecidual	Ligas de titânio Hidroxiapatita Cálcio Fosfato Vidros Bioativos
Terceira	Biodegradável	Regeneração tecidual	Ligas de magnésio Biovidro degradável Polímeros degradáveis

Fonte: Adaptado de Zberg et al. (2009).

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015), apresentando propriedades físico-químicas e mecânicas compatíveis às dos tecidos biológicos, costumando ser mais baratos do que as estruturas biológicas, podendo ser produzidos em grandes quantidades (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011).

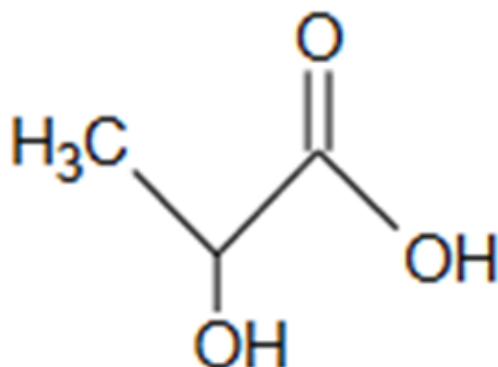
Esses materiais poliméricos são atualmente dominados por poliésteres termoplásticos (fundem por aquecimento e solidificam por resfriamento), como poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glicólico) (PGA), policaprolactona (PCL) e suas misturas ou co polímeros (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001). Poliéster é uma categoria de polímeros que contém o grupo funcional éster em sua cadeia principal. Ésteres são compostos químicos derivados de um ácido carboxílico (grupo COOH) e um composto hidroxila (OH), geralmente um álcool (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013).

A principal vantagem de aplicação dessa classe de polímeros deve-se a capacidade desses materiais suportarem o processo de crescimento e remodelação tecidual por um período antes de serem degradados e seus produtos, reabsorvidos pelo corpo (LIU; LIM; TEOH, 2013). Os polímeros são macromoléculas, de alto peso molecular, sintetizadas a partir de várias unidades de monômeros de repetição por ligação covalente (PARK et al., 2016), podendo ser classificados como naturais (polissacáridos e proteínas) ou sintéticos (ésteres, amidas, éteres, uretanos).

2.3. Poli (Ácido Láctico) – (PLA)

O PLA de alto peso molecular (**Fig. 2**) é geralmente produzido por policondensação e / ou polimerização de abertura de anel de ácido láctico ($\text{HO} - \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{COOH}$), um ácido orgânico de origem biológica, que pode ser produzido por fermentação de açúcares obtidos a partir de recursos renováveis como a cana-de-açúcar (XIAO et al., 2012).

Figura 2- Estrutura do monômero do PLA.



Fonte: Oliveira (2020).

Devido ao seu histórico de aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) (YU et al., 2010), além da biocompatibilidade e propriedades mecânicas, o PLA e seus copolímeros estão se tornando os mais comumente utilizados na engenharia tecidual para restaurar e reconstruir a função dos tecidos prejudicados (GREGOR et al., 2017). Além disso apresenta baixa toxicidade, baixo impacto ambiental, estabilidade térmica e possibilidade de suportar cargas (BOSE; ROY; BANDYOPADHYAY, 2012).

Embora essas propriedades justifique o crescente interesse na aplicação desses materiais, polímeros biorreabsorvíveis são classificados como bioinertes e, portanto, não são capazes de estimular interações biológicas específicas na interface biomaterial-célula-tecido receptor (WILLIAMS, 2008). Além disso, muitos desses materiais apresentam baixa hidrofiliabilidade, prejudicando o processo de adsorção de proteínas e outros fatores biológicos que estão relacionados ao processo inicial de adesão, espreadimento e migração celular (SANTOSMIRANDA et al., 2006).

Portanto, polímeros são comumente submetidos á técnicas de modificação de superfície. A modulação de características tais como rugosidade, porosidade, presença de grupos químicos funcionais e incorporação de moléculas biológicas bioativas à superfície do material permite a regulação da integração de material no interior do corpo, bem como a orientação de respostas específicas (MA; MAO; GAO, 2007; ROACH et al., 2007).

Como os *scaffolds* poliméricos não apresentam sítios naturais de reconhecimento celular, a ligação das células à superfície do material ocorre através de proteínas provenientes do meio de cultura ou fase inicial de implantação, as quais são adsorvidas pela matriz polimérica e, então, atuam como sítios de ligação (BAČÁKOVÁ et al., 2004). Portanto vários fatores estão constantemente sendo avaliados tais como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento tipo insulina (IGFs), fatores transformadores de crescimento beta (TGF- β) e vitamina D3 (MOSTAFA et al., 2012; WANG et al., 2012).

2.4. Modificação de superfície do PLA

A característica hidrofóbica do PLA, é a sua principal desvantagem podendo resultar em baixa afinidade celular (MOHD SABEE et al., 2016). Assim, o PLA necessita ser modificado superficialmente a fim de introduzir hidrofiliidade, de modo que a propriedade de biocompatibilidade seja aumentada (JACOBS et al., 2012).

Existem vários estudos sobre o tratamento de superfície e modificação de superfícies de PLA, com plasma de oxigênio (LORENZO et al., 2020;

YAMAGUCHI et al., 2004) plasma frio (JORDÁ-VILAPLANA et al., 2014), nanopartículas de quitosana/polifosfato de sódio (DRIUSSI; MATOS, 2017) por exemplo. No entanto, muitos métodos existentes, como revestimento, aprisionamento, conjugação química, tratamento por radiação e enxertia fotográfica são frequentemente caros, demorados e às vezes difíceis de realizar (MOHD SABEE et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2020).

A modificação química é basicamente o método mais simples por meio de hidrólise de superfície com um tratamento alcalino ou de aminólise. Os ácidos carboxílicos hidrofílicos ($-\text{COOH}$) e hidroxil ($-\text{OH}$) ou amina reativa ($-\text{NH}_2$) grupos serão introduzidos através da clivagem das ligações éster que podem ser usadas para ligar moléculas bioativas, como RGD, quitosana, PEG e colágeno (ZHU et al., 2004; WANG; CUI; BEI, 2005) para regular a adesão celular ou absorção de proteínas.

O hidróxido de sódio, portanto é barato, fácil de se comprar, e a reação de hidrólise do PLA com NaOH é simples de se realizar. Existem várias pesquisas que tem demonstrado os efeitos do tratamento com NaOH nas superfícies de PLA (SCHNEIDER et al., 2020).

Mohd Sabee e colaboradores (2016), usaram tratamentos de solução de NaOH para modificação de superfície de microesferas de PLA, e encontraram uma alteração das propriedades da superfície das partículas, de hidrofóbica para hidrofílica. Além disso, os grupos funcionais ($-\text{OH}$) que foram introduzidos durante o tratamento de superfície resultaram em maior viabilidade celular, conforme mostrado em microesferas tratadas com NaOH 0,5 M.

O tratamento com NaOH também foi investigado em poli (ácido láctico-co-glicólico). Foi encontrado mudanças nas propriedades da superfície, com

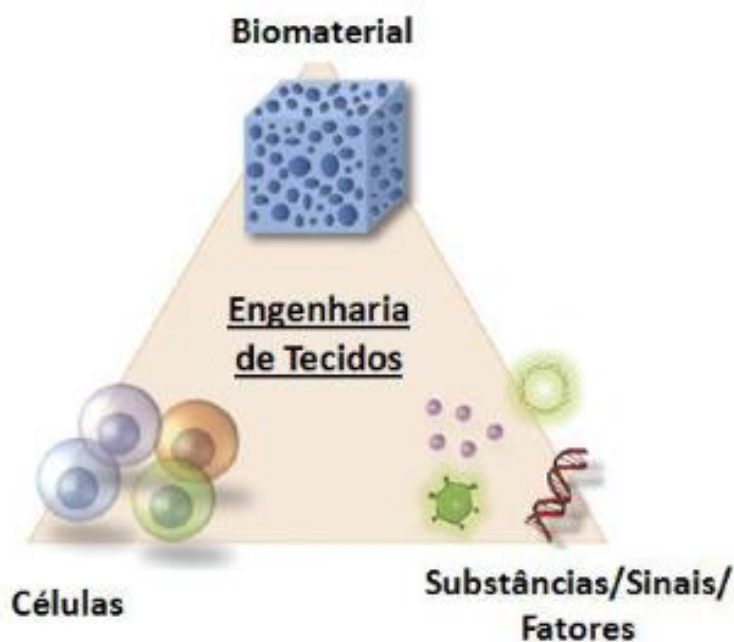
ângulos de contato diminuídos, após um curto período de tratamento com baixas concentrações de NaOH (CROLL et al., 2004).

2.5. Medicina Regenerativa

A engenharia de tecidos, tornou-se uma das alternativas mais promissoras usadas para regeneração e reconstrução de cartilagem e tecido ósseo (LIU et al., 2017). Ela parte do princípio de que um tecido é composto por um *scaffold*, células e fatores de crescimento para produzir a diferenciação e crescimento celular (**Fig. 3**) (HOLZWARTEH; MA, 2011; SAHNI et al., 2014).

O entendimento do funcionamento de cada um desses pilares é importante para a otimização de processos associados a reconstrução do tecido ósseo. As células tem papel fundamental para o estabelecimento das funções do órgão, os sinais utilizados na engenharia de tecidos podem ser fatores de crescimento de diferenciação e proliferação que propiciarão o aceleração ou inibição de mecanismos no processo de formação óssea, como a osteoindução, e os biomateriais (*scaffolds*) com estrutura tridimensional porosa que terão a função de abrigar tanto estas substâncias bem como permitir a adesão e nutrição das células (APPEL et al., 2013; SUN; TAN, 2013).

Figura 3 – Tríade da Medicina Regenerativa.



Fonte: Glotzbach et al.(2011).

Independentemente do tipo de tecido, uma série de considerações são importantes ao projetar um *scaffold* para uso em engenharia de tecidos. A biocompatibilidade é uma delas, biodegradabilidade, propriedades mecânicas compatíveis com o local anatômico no qual será implantado e a arquitetura do suporte (GROTTKAU; LIN, 2013).

A porosidade interconectada do *scaffold* permite a proliferação celular e o transporte de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento, favorecendo o crescimento contínuo do tecido (FERRONI et al., 2015; BRUNELLO et al., 2016). O diâmetro de poro ideal é considerado entre 100 e 300 μm (BAPTISTA; GUEDES, 2021), enquanto alguns estudos demonstraram que a coexistência de microporos (10-60 μm) leva a uma proliferação celular melhorada (LI et al., 2013; CHOI et al., 2020).

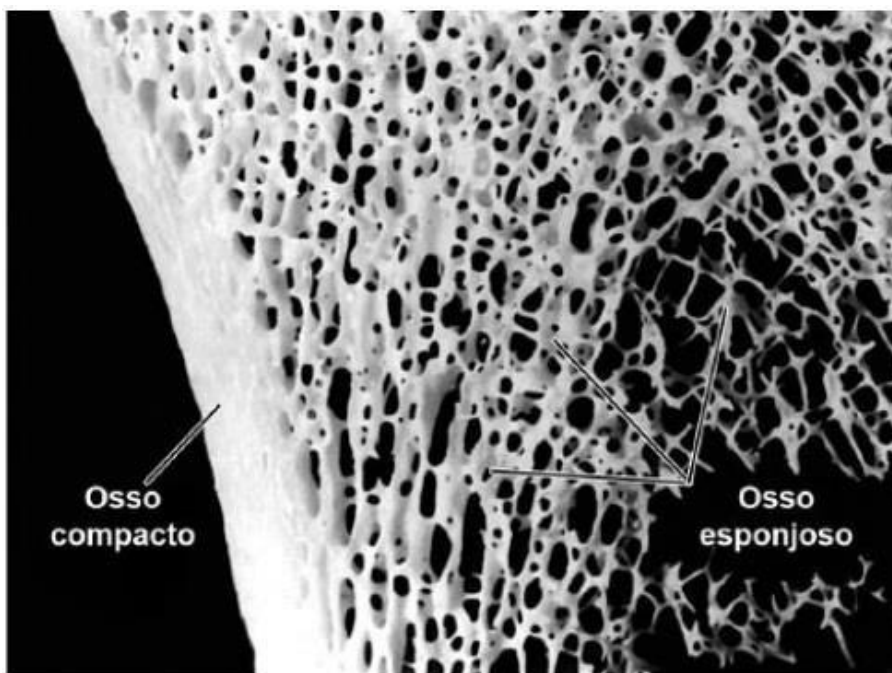
2.6. Tecido Ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo, caracterizando-se por ser mineralizado, vascularizado, rígido e resistente (DUCY; SCHINKE; KARSENTY, 2000). Confere estabilidade mecânica necessária para suporte de carga, proporcionando proteção aos órgãos internos e movimentos, além de servir como reserva mineral (KNESER et al., 2006).

É composto pela matriz orgânica, componente mineral e células. A matriz orgânica é constituída de proteínas, como osteocalcina, osteopontina, proteínas morfogenéticas ósseas, fibras de colágeno tipo I e III, entre outras. Já o componente mineral é constituído de água, compostos de fosfato de cálcio, principalmente na forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA), bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato (MONTANARI, 2016; SEEMAN, 2008).

O tecido ósseo (**Fig.4**), é organizado em osso cortical (com menos de 10% de porosidade e presente em ossos longos, curtos e planos) e trabecular, sendo esponjoso alojando a medula óssea, estando presente na metáfise dos ossos longos, na crista ilíaca e nos corpos vertebrais (CLENDENIN, 1978). Ambos os tipos de ossos passam por remodelação dinâmica, maturação, diferenciação e reabsorção controladas através de interações entre suas células (BOSE; VAHABZADEH; BANDYOPADHYAY, 2013).

Figura 4 – Corte transversal de um osso demonstrando sua estrutura interna. O osso compacto denso externo (também chamado de osso cortical) e o osso interno esponjoso preenchido com espículas (trabecular).



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

A capacidade regenerativa dos ossos é dependente da quantidade de massa óssea perdida e/ou danificada (MOURIÑO; BOCCACCINI, 2010) entretanto, defeitos ósseos em grande escala não podem ser curados completamente (CARRINGTON, 2005) e na maioria dos casos, a intervenção externa é necessária para a restauração.

Enxertos ósseos, incluindo autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos, têm sido amplamente utilizados para regenerar esses defeitos. No entanto, os enxertos ósseos tradicionais apresentam algumas desvantagens, como o suprimento limitado, a reação imune e a transferência de patógenos (ORYAN et al., 2014).

Portanto, o desenvolvimento de substitutos ósseos avançados com

excelente capacidade osteogênica que possam suportar o tecido danificado, induzir a diferenciação osteogênica e restabelecer a estrutura original e a função do tecido danificado é indispensável (TANG et al., 2016).

2.7. Células ósseas

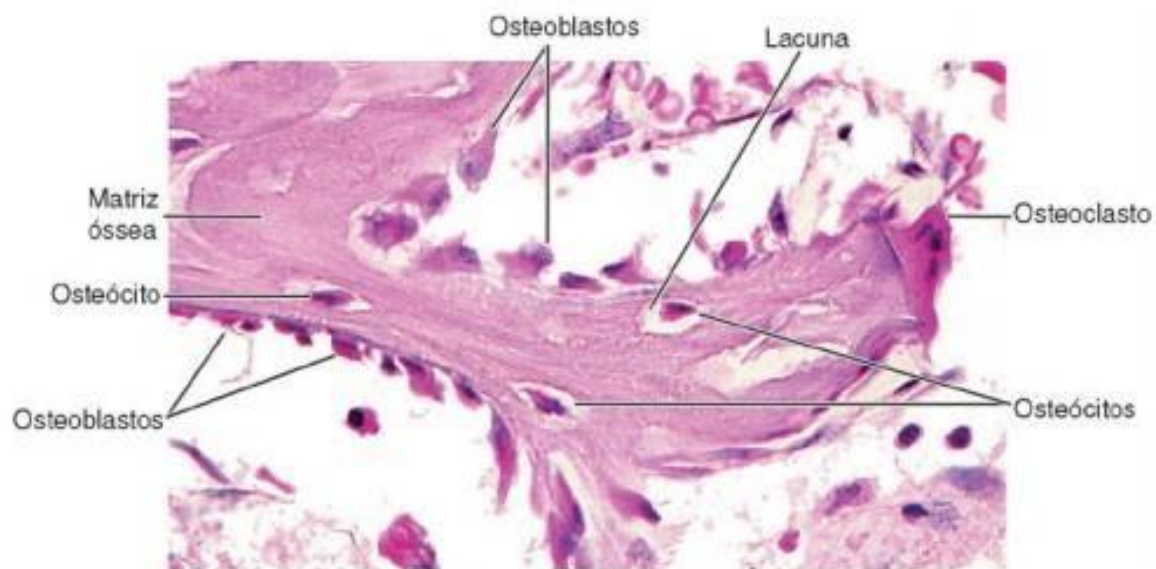
As células que compõem o tecido ósseo são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (**Fig.5**), os quais possuem diferentes origens e funções, sendo de extrema importância na remodelação óssea. Essas células específicas estão inseridas em uma matriz que consiste em um componente mineralizado e um não mineralizado (HEINEGARD, 1974).

Os osteoblastos são de origem mesenquimal, caracterizando-se por possuir grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, sintetizando os componentes de matriz orgânica (ANDRADE, 2007). São ricos em fosfatase alcalina, enzima fundamental na deposição de matriz mineralizada. Encontram-se na matriz da superfície óssea (osteoblastos de superfície) ou depositando camadas de tecido ósseo recém sintetizadas sobre estas (osteoblastos mesenquimais) (MARIE, 2008; MARQUIS et al., 2009).

Os osteócitos são células maduras derivadas dos osteoblastos, residentes em lacunas da matriz óssea. Irradiam canálculos que entram em contato com outros compartilhando íons, nutrientes e fluido extracelular. Estas células secretam a osteocalcina, uma proteína não colágena que exerce função na mineralização óssea e homeostase do cálcio no organismo (Alberts et al, 2005). Os osteoclastos são células diferenciadas a partir de células de linhagem hematopoiética da medula óssea sendo responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. São multinucleadas e contêm alta

concentração de mitocôndrias e lisossomos. Os osteoclastos são encontrados em depressões, denominadas lacunas de *Howship* (Dougall & Chaisson, 2006).

Figura 5 - Células do tecido ósseo



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013).

2.8. Remodelamento ósseo

O osso está em constante estado de remodelação, o qual é importante para a manutenção da estrutura e função esquelética normal. Essa remodelação se dá em um ciclo composto por três fases: iniciação da reabsorção óssea pelos osteoclastos, transição da reabsorção para a nova formação óssea, e formação óssea por osteoblastos (MATSUO; IRIE, 2008; SIMS; GOOI, 2008).

Este processo ocorre devido a ações coordenadas de osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo que juntos formam a estrutura anatômica temporária denominada unidade multicelular básica (BMU) (ANDERSEN et al., 2009). Além de preservar a integridade óssea, a

remodelação também otimiza a sua função e previne a degradação, visando não só uma adaptação da estrutura óssea às solicitações mecânicas, como também a remoção de áreas danificadas (MARTIN; SEEMAN, 2008).

Entretanto, um desequilíbrio na reabsorção e formação óssea resulta em várias doenças. Por exemplo, a reabsorção excessiva pelos osteoclastos sem a quantidade necessária de osso neoformado pelos osteoblastos contribui para a osteoporose (HAUGE EM, QVESEL D, ERIKSEN EF, MOSEKILDE L, 2001) enquanto o contrário pode resultar em osteopetrose (SOBACCHI et al., 2013).

Portanto, para que haja equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea é necessário e depende da ação de vários fatores de crescimento incluindo proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), progranulina (PGRN), ativinas, fator de diferenciação de crescimento (GDF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas, prostaglandinas, hormônio da paratireóide (PTH), esteróides, crescimento hormônios e vitamina D (AGRAWAL; SINHA, 2017; CROCKETT et al., 2011; PHAN; XU; ZHENG, 2004).

2.9. Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs)

As BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas) são um grupo de citocinas da superfamília TGF- β responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea. Essa atividade

osteointutora das proteínas acrescida à sua presença no tecido ósseo sugere que elas são importantes reguladoras no processo de reparação óssea e podem estar envolvidas na manutenção destes tecidos (KHOJASTEH et al., 2013; XIAO; XIANG; SHAO, 2007).

As BMPs purificadas até então são: BMP-1; BMP-2; BMP-3 (Osteogenina); BMP-4; BMP-5; BMP-6, BMP-7 e BMP-8, cada uma com uma capacidade osteointutora diferente (RIPAMONTI; REDDI, 1994). Contudo, as BMPs recombinantes 2, 4 e 7 tem se destacado por desempenharem um papel importante na osteogênese, sendo amplamente estudadas (KHOJASTEH et al., 2013) e utilizadas como componentes osteointutores em produtos na engenharia de tecidos (LEE et al., 2010). Além de serem indicadas para fraturas expostas da diáfise da tíbia (JUNG et al., 2017; LANE; SILVERMAN, 2010).

Outros estudos sugerem a capacidade dessas formas recombinantes de BMPs em curar defeitos em ossos de roedores e primatas não humanos quando combinados com um transportador de colágeno, matriz óssea desmineralizada extraída com guanidina, hidroxapatita ou polímeros biodegradáveis (GAUTSCHI; FREY; ZELLWEGER, 2007; KANG et al., 2004).

A atividade biológica das BMPs foi atribuída a Marshal Urist em 1965, quando demonstrou que algumas proteínas, extraídas do osso de roedores e implantadas em áreas sem a presença de tecido ósseo, induziam a formação de tecido cartilaginoso e osso (URIST; MCLEAN, 1965). No entanto somente 20 anos mais tarde, WOZNEY e colaboradores, clonaram os genes das BMPs (WOZNEY, 1992). Desde então, as rhBMPs têm sido estudadas na tentativa de neoformação óssea por apresentarem alta capacidade osteointutora e fácil produção em grande escala.

Um estudo de Marden e colaboradores (1994), demonstrou pela primeira vez que uma BMP recombinante (rhBMP-2) reconstituída com matriz óssea colagenosa insolúvel foi suficiente para reparar defeitos por craniotomia em rato (MARDEN et al., 1994). O mecanismo pelo qual essa proteína acelera a regeneração óssea pode ser explicado pela conversão de células pluripotenciais em osteoblastos e está diretamente relacionada à dose da proteína osseointutiva (SIGURDSSON et al., 1995).

Vários trabalhos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as BMPs são importantes fatores de crescimento, proporcionando bons resultados em regeneração óssea (RONGA et al., 2013), preenchimento de defeitos provocados por doença periodontal e maxilomandibulares, sendo os mais efetivos na cicatrização de fraturas e implantes dentários (KANG et al., 2019).

Devido aos excelentes resultados descritos em trabalhos com o uso da rhBMP-2 em humanos na área médica o FDA (*Food and Drug Administration*), aprovou em 2002, a comercialização da proteína, a qual foi introduzida no mercado com o nome de Infuse® Bone Graft, passando a ser utilizado no tratamento de traumas ósseos (ROCHA VALADAS MARQUES et al., 2016).

Apesar de as BMPs induzirem formação óssea quando implantadas sozinhas, associadas com outros substratos ou meios, consegue-se resultados mais efetivos (FU et al., 2017; SHUANG et al., 2016). Estudos sugerem que o efeito terapêutico da rhBMP-2 depende da sua concentração, tempo de aplicação e transporte adequado para a entrega, retenção e liberação no local implantado (AGRAWAL; SINHA, 2017). O carreador deve ser absorvível na medida em que for ocorrendo à formação óssea, além de seguro, biodegradável, biocompatível e formulado para permitir tamanhos e formas adequadas para o

enxerto (KHOJASTEH et al., 2013).

Dentre os materiais testados em associação as BMPs, destaca-se a esponja de colágeno reabsorvível (BOERCKEL et al., 2011), osso bovino (HUH et al., 2015), implantes metálicos, nanopartículas (AGRAWAL; SINHA, 2017) e os biopolímeros (CHEN et al., 2017).

No ano de 2017 a Professora Dra. Mônica R. C. Iemma, docente do PPGB-MRQM/UNIARA e integrante do Grupo de Pesquisa Quimera da UNIARA (Universidade de Araraquara) em parceria com a Prof. Dra. Heloísa S. Selistre de Araújo, do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar desenvolveram um sistema de expressão da rhBMP-2 em linhagem de *Escherichia coli* no plasmídeo pET-32a(+). *E. coli* como sistema de expressão está atualmente em crescente desenvolvimento por representar um sistema de produção rápido e econômico dessas proteínas (LEE et al., 2010; ZHANG et al., 2010).

Este trabalho foi parte da dissertação de Mestrado da aluna Ana Lucia Colange do PPGB- MRQM/UNIARA (COLANGE, 2017) e parte da metodologia foi realizada no trabalho de conclusão de curso desenvolvido pelo aluno Carlos Sabino de Oliveira do Curso de Ciências Biológicas da UNIARA e do Programa de Iniciação Científica do PPGB-MRQM (PIC-Biotec), ambos sob a orientação da Profa. Mônica.

3. Hipótese

É possível construir um *scaffold* 3D, bioativo para reparo ósseo, modificando-o quimicamente com hidróxido de sódio e o funcionalizando com a rhBMP-2, tendo efeitos sobre a proliferação, adesão e mineralização de osteoblastos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

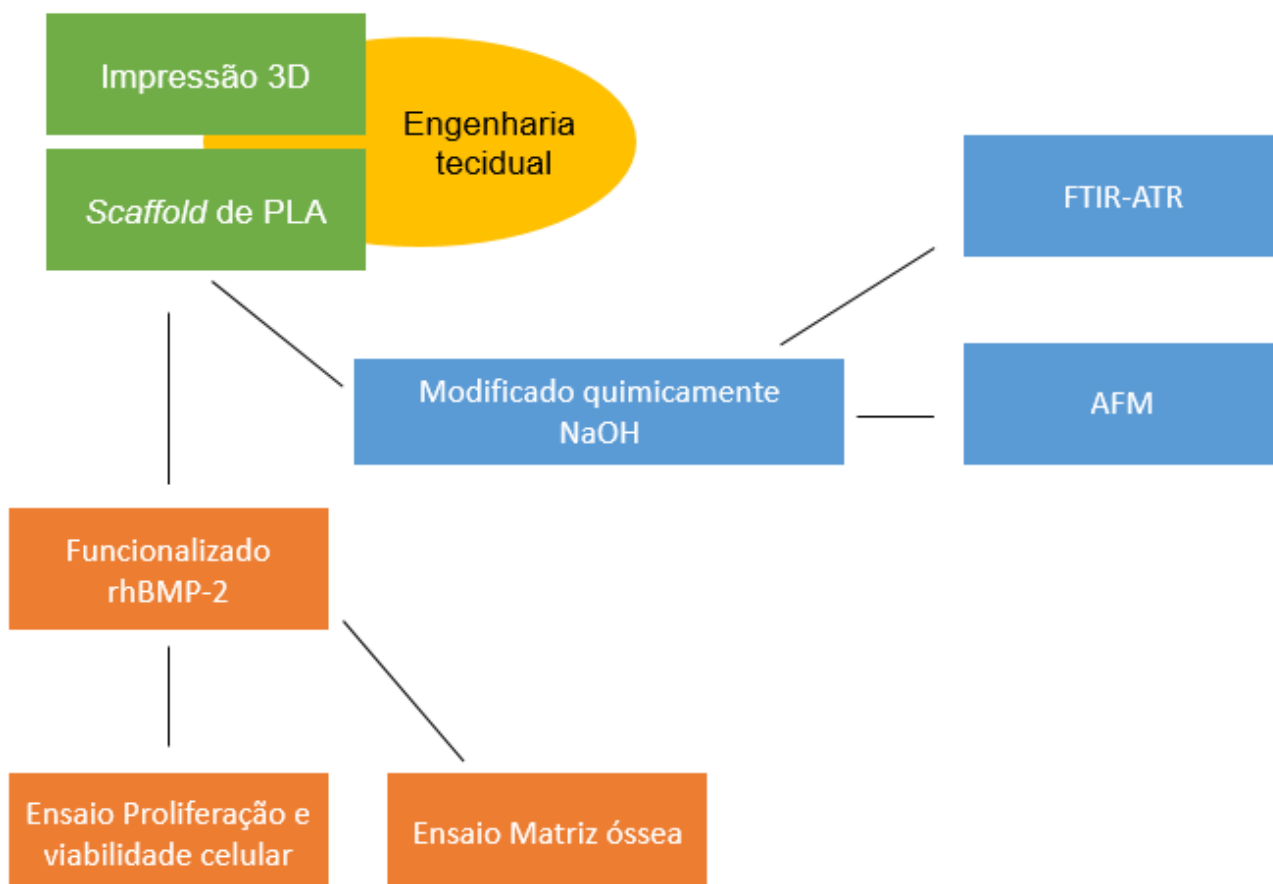
Avaliar a proliferação e mineralização das células pré-osteoblasticas de rato (MC3T3-E1) cultivadas na presença de *scaffold* de PLA 3D modificados quimicamente, associado com a proteína rh-BMP2.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar aspectos físico-químicos do PLA.
- Avaliar Viabilidade e Proliferação celular por meio da detecção da atividade mitocondrial pelo método fluorimétrico com o reagente resazurina.
- Avaliar a síntese de matriz óssea por meio do método colorimétrico de detecção de cristais de hidroxiapatita, utilizando o vermelho de alizarina.
- Avaliar a adsorção da rhBMP-2 nos *scaffolds* de PLA tratados ou não com NaOH.

5. Metodologia:

Esquema da metodologia do trabalho.



5.1. Obtenção dos *scaffolds* de PLA

Os *scaffolds* de PLA (**Fig. 6**) foram impressos na forma de discos pequenos discos com diâmetros de 11,7mm e 15,7mm pela técnica FDM (fused deposition modeling), a partir de uma impressora 3D (Boa impressão 3D, modelo Stella) do laboratório BioPolMat/UNIARA, em colaboração com o Prof. Dr. Hernane Barud, docente do PPGB-MRQM/UNIARA. Foi utilizado o software Repetier Host e Slic3r para ajustar as configurações de fatiamento, temperatura e velocidade de impressão dos protótipos. A temperatura utilizada na cabeça extrusora da impressora foi de 170°C, com velocidade de impressão de 15 mm/s e preenchimento de 20%. O filamento utilizado foi da marca Movitech, modelo natural.

Figura 6- *Scaffold* de polímero PLA em comparação com moeda.



Foto: Autoria Própria

5.2. Tratamento dos *scaffolds* com NaOH

Os *scaffolds* foram lavados com água destilada em agitação durante 1 hora. Após a lavagem para retirada de impurezas, os suportes foram submersos a diferentes concentrações de NaOH (0,25; 0,5; 1,0 mol/L) e controle (PLA sem tratamento) por 1 hora, após, foram lavados com água destilada por 24 horas e secos em estufa.

5.3. Esterilização dos *scaffolds* de PLA para cultivo celular

Os suportes de PLA foram submersos em álcool 70% e expostos a luz ultravioleta em fluxo laminar até completa evaporação do álcool, após, foram lavados com PBS estéril.

5.4. Cultivo celular

Células da linhagem estabelecida (MC3T3-E1) pré-osteoblastica (**Fig. 10**) foram cultivadas em frascos de cultivo de 25cm² na presença de meio α -MEM (Alpha Minimum Essential Medium), contendo 0.1% antibiótico/antimicótico e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em estufa humidificada a temperatura de 37°C com injeção de 5% de CO₂.

Figura 10 – Células MC3T3-E1 semiconfluentes, em meio de cultivo α - MEM suplementado com 10% de SFB. Microscópio Invertido - Aumento de 40X. As setas representam as células.

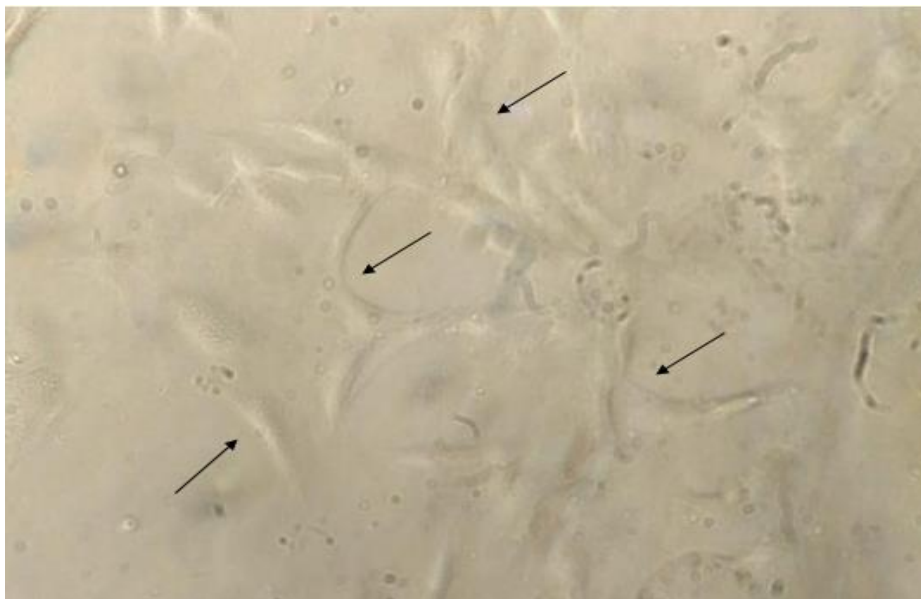


Foto: Autoria própria

5.5. Avaliação da adesão e proliferação celular por meio do reagente resazurina

Para verificar a viabilidade e proliferação celular, adotou-se o método da resazurina. A resazurina é um corante redox utilizado como indicativo de atividade metabólica em culturas celulares e possui inúmeras aplicações, como por exemplo estudos de toxicidade, proliferação e viabilidade celular (RAMBERSAD, 2012). Em solução aquosa, a resazurina possui cor azul (baixa fluorescência) e quando sofre redução para resorufina, adquire a cor rosa (alta fluorescência). A quantidade de resorufina produzida (fluorescência) é proporcional ao número de células viáveis (REID et al., 2004).

Os *scaffolds* de PLA foram incubados 24 horas antes da semeadura em placa de 48 poços, somente com meio de cultivo. Após o período de incubação

o meio foi removido e as células foram semeadas ($1,0 \times 10^4$ células por poço) e incubadas por 24 horas para adesão ao PLA. Em seguida, o meio foi removido e a solução de resazurina 10% (v/v em meio α -MEM) foi adicionada em cada poço e a placa incubada por 4 horas em estufa a 37°C. Logo após o período de incubação uma alíquota do meio foi transferida para uma placa de 96 poços e a fluorescência foi medida no leitor de placa Spectra Max i3 Molecular Devices. O restante da solução da resazurina foi removida, o meio de cultivo foi acrescentado e as células permaneceram em cultivo por mais 14 dias, sendo que a cada dois dias foi analisada a fluorescência pelo mesmo processo descrito acima.

5.6. Adsorção da rhBMP-2

Os *scaffolds* tratados com NaOH e não tratados foram colocados em uma placa de 24 poços contendo ou não a rhBMP-2 em solução PBS 1X com concentração inicial conhecida. Após 24 horas de incubação a rhBMP-2 foi removida e concentração da solução de rhBMP-2 foi verificada por espectrofotometria (NanoDrop). Para avaliar a quantidade adsorvida pelo suporte os valores da concentração inicial foram comparados com os da concentração final.

5.7 Ensaio de síntese de matriz óssea por meio do método colorimétrico com vermelho de Alizarina

Em seguida ao protocolo de adsorção da rhBMP-2, as células MC3T3-E1 foram semeadas (1×10^5 células/poço) sobre os suportes adsorvidos ou não, e

cultivadas em meio α -MEM suplementado com 10% FBS por um período de 24 horas. Após este período, o meio foi removido e o meio de diferenciação (α -MEM suplementado com 10% SFB, 10 mM de β -glicofosfato, 01 mM de dexametasona e 50 mM de ácido ascórbico) foi adicionado aos poços com PLA sem rhBMP-2 e nos poços com PLA + rhBMP-2 foi adicionado meio α -MEM suplementado com 0,5% de FBS. Os meios foram trocados a cada 3 dias e a cultivo permaneceu por 14 dias. Terminado o período de 14 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% e em seguida foi realizada a coloração com vermelho de alizarina para a detecção dos nódulos de hidroxiapatita para a verificação da presença de matriz mineralizada. Depois de fixadas, as células cultivadas na presença ou não do suporte foram incubadas em solução de vermelho de alizarina 1mg/mL (Alizarin Red S) por 30 minutos a temperatura ambiente e lavadas com água destilada para a remoção do excesso do corante.

5.8 Caracterização dos suportes de PLA

5.8.1 FTIR-ATR

A técnica de FTIR-ATR (Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflectância Total Atenuada) é uma técnica sensível às interações intermoleculares. A técnica foi usada para monitorar picos de absorção em regiões específicas para determinar as interações entre os grupos funcionais do

PLA e a mudança a eles causados pela modificação com NaOH. Para a análise foi utilizado o equipamento Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700. O espectro foi obtido entre as frequências de 4000 e 270 cm^{-1} . As análises foram obtidas em colaboração com a Prof.^a Dra. Sandra Andrea Cruz e seu aluno Iago

Malvestio de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

5.8.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM) é uma técnica de análise que consiste na varredura da superfície de uma amostra com uma sonda a fim de obter sua imagem topográfica com resolução atômica. O AFM opera medindo as forças entre a ponteira e a amostra que dependem de diversos fatores como, por exemplo, dos materiais que compõem a amostra e a ponteira, da distância entre elas, da geometria da ponteira e de qualquer tipo de contaminação que houver sobre a superfície da amostra. O detector mede a flexão que ocorre quando a ponta varre a superfície. As análises foram obtidas em colaboração com a Prof.^a Dra. Sandra Andrea Cruz, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

6. Resultados e Discussão

6.1. FTIR-ATR

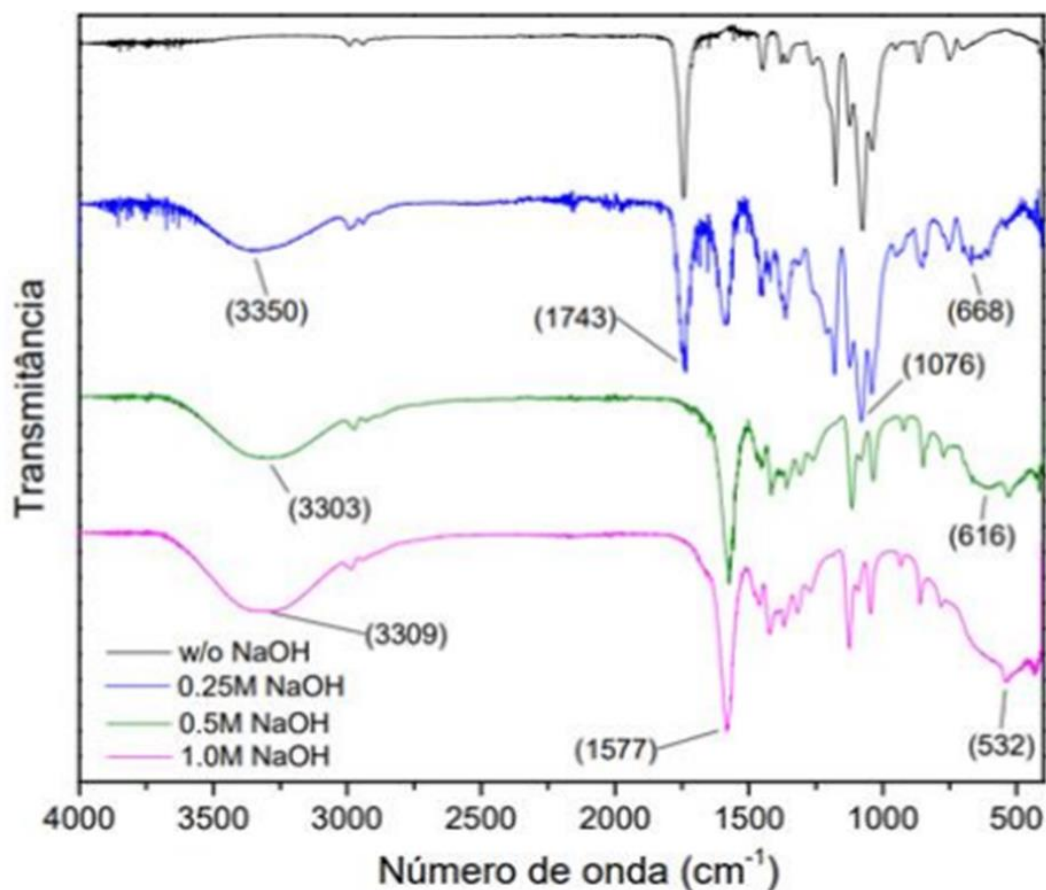
Os resultados da técnica de FTIR-ATR são apresentados a seguir (**Fig. 8**). Característico da eficácia do tratamento alcalino é o surgimento de bandas características de -OH , em torno de 3300 cm^{-1} , o que é observado no espectro.

Além disso, com o aumento da concentração da solução de NaOH, essa banda aumenta de intensidade, sendo maior na concentração de 1.0M. Essas bandas podem ser observadas na figura em 3350 , 3303 e 3309 cm^{-1} respectivamente para as concentrações de 0.25, 0.5 e 1.0 M de NaOH.

Outros picos detectados são os de deformação axial (bending) do C=O , comumente em torno de 1750 cm^{-1} , que podem ser observadas nessa região nos dois primeiros espectros – sem tratamento e tratados com solução 0.25 M de NaOH.

Para os demais tratamentos, com soluções mais concentradas, essa banda sofre uma mudança, sendo observadas em 1577 cm^{-1} , podendo ser explicado pela troca de grupo funcional. Enquanto que nos dois primeiros espectros (w/o NaOH e 0,25M) existe uma presença majoritária de grupos éster, nos outros dois espectros com concentrações alcalinas maiores (0,5 e 1,0 M), os grupos éster vão sendo substituídos por ácidos carboxílicos e hidroxilas.

Figura 8- Tratamento dos *scaffolds* de PLA em soluções de NaOH em diferentes concentrações. O espectro compara esses diferentes tratamentos com o polímero não tratado (w/o).



Embora o PLA contenha uma ligação éster localizada nas cadeias principais (grupo funcional polar) a superfície do PLA ainda necessitava de um grupo funcional hidrofílico. A hidrólise de ligações éster cria novos grupos terminais que são grupos carboxila e hidroxila que podem melhorar a hidrofiliabilidade dos *scaffolds* de PLA (THAM et al., 2014).

A hidrólise é um processo que leva à clivagem de um composto para gerar outro composto por meio da ação da água (MOURA; SUYANTO, 2004), e vem sendo uma das alternativas para o tratamento químico da superfície do PLA

(SCHNEIDER et al., 2020). Na hidrólise alcalina do polímero de PLA, o íon hidróxido extra é fornecido pelo hidróxido de sódio que atua como enzima para acelerar a hidrólise na modificação da superfície, e a reação é conduzida via ataque nucleofílico de íons hidróxido no carbono carbonil (CROLL et al., 2004).

6.2. AFM

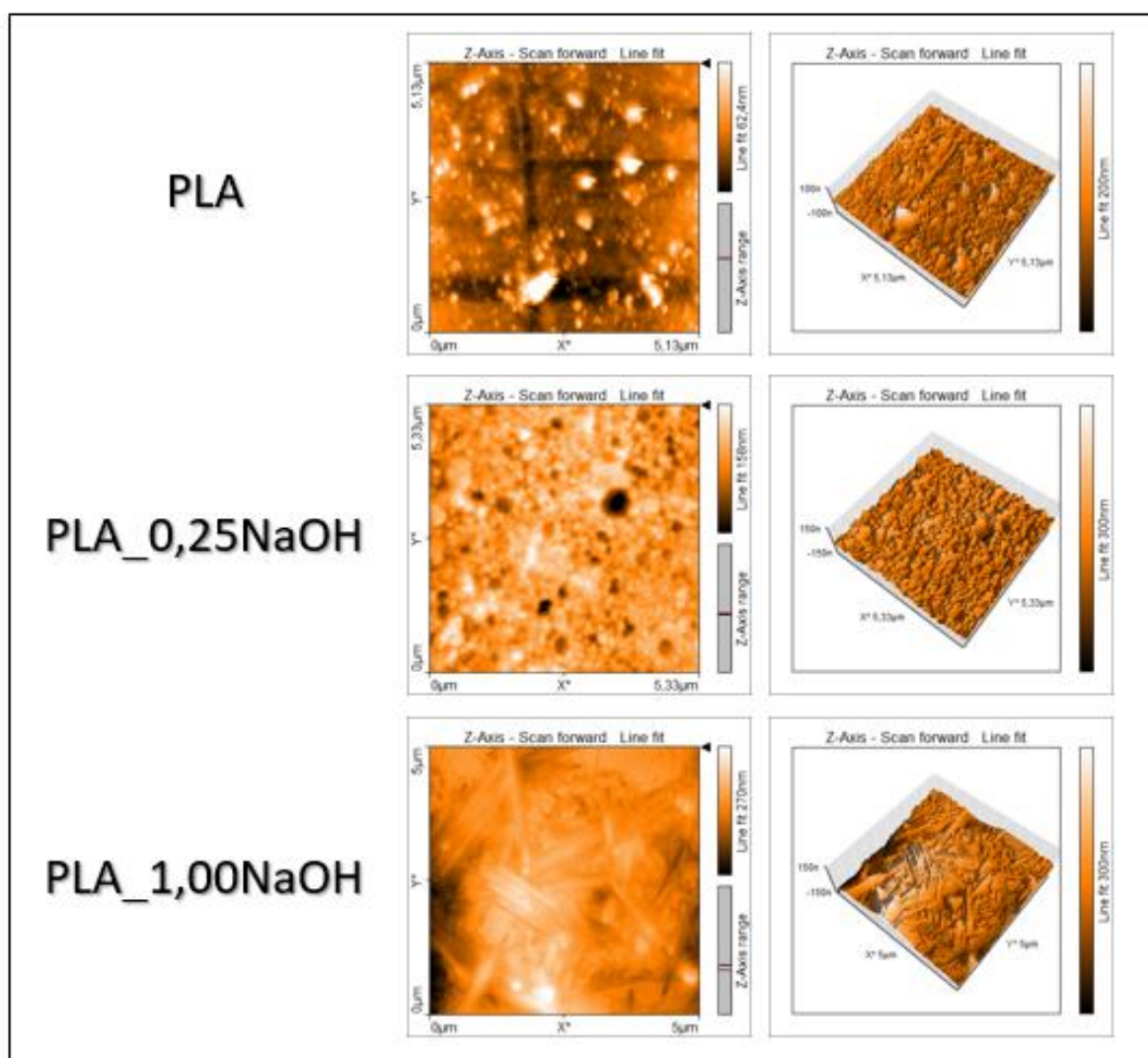
A análise qualitativa da superfície do PLA hidrolisado com NaOH também foi investigada por microscopia de força atômica (AFM). As imagens de AFM mostram as modificações da superfície do polímero tratado com diferentes concentrações de NaOH (**Fig.9**). Com isso, o AFM revela observações interessantes: pode-se notar um aumento da rugosidade do tratamento com 0,25M de NaOH, quando comparado com a amostra padrão de PLA puro, além disso, o PLA tratado com 1,0M NaOH apresentou uma característica ainda mais interessante com a formação de uma superfície ainda mais rugosa e com microagulhas, notando-se uma maior erosão da superfície e maior profundidade.

Schneider e colaboradores (2020) observaram o mesmo efeito rugoso com a modificação da superfície e um aumento dos defeitos superficiais quando aumentada a concentração de NaOH e o tempo de exposição. Trang e colaboradores (2018) também avaliaram o mesmo efeito, porém em Nano particulados de PLA. Seus resultados também mostraram um aumento da rugosidade com o aumento da concentração da base.

Esses resultados associados aos resultados de FTIR corroboram com a efetiva modificação superficial do PLA. Sendo esta modificação com NaOH

simples e barata, pode levar a uma ainda maior biocompatibilidade do polímero devido ao aumento da hidrofiliicidade (NOR et al., 2015).

Figura 9- Imagens de AFM mostram as modificações da superfície do polímero PLA tratado com diferentes concentrações de NaOH (controle, 0,25 e 1,0 M de NaOH).

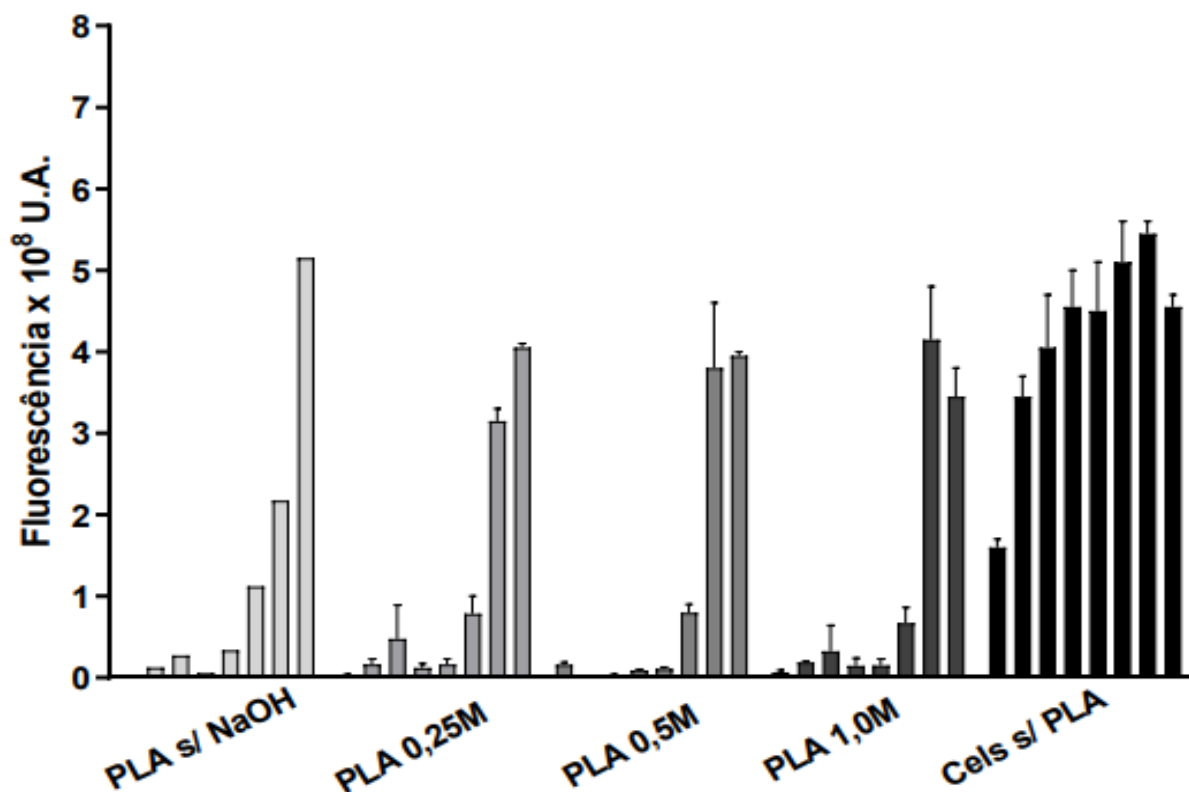


6.3. Ensaio de proliferação e viabilidade celular

Os resultados obtidos a partir do ensaio de resazurina (**Fig. 10**) demonstram que a modificação química do NaOH nos *scaffolds* de PLA, não alterou a viabilidade celular de células MC3T3-E1 em nenhuma concentração, sugestionando até uma proliferação celular pelo incremento da fluorescência ao longo do período de incubação (15 dias). Tempo o qual foi feito o ensaio para a detecção dos nódulos de mineralização para a verificação da presença de matriz óssea.

Ainda, na concentração de 0,25M nota-se uma viabilidade melhor das células, podendo ser atribuída ao fato de que nessa concentração, a modificação química ainda seja leve. Já na concentração de 0,25M e 1,0M ocorre uma modificação mais agressiva com a introdução de novos grupos funcionais e a perda de outros que poderiam ser interessantes para as células.

Figura 10- Viabilidade de células MC3T3-E1 cultivadas sobre *scaffolds* de PLA tratados com diferentes concentrações de NaOH, em diferentes dias (1,3,5,7,9,11 e 15). As barras representam os diferentes dias de tratamento.



A adesão e proliferação celular a superfície de um *scaffold*, é considerada a relação mais importante no processo de interação célula-*scaffold*. Já que, somente depois de aderidas, as células vão espriar, proliferar e sintetizar matriz extracelular nova (JR; WADA, 2007).

Superfícies com moderada hidrofiliçidade, presença de cargas funcionais, dureza e micro-nanorugosidade têm demonstrado colaborar com a diferenciação de vários tipos celulares, como as células tronco mesenquimais (PRABHAKARAN et al., 2012), o que corrobora com nosso trabalho.

Outra questão relevante para a adesão e proliferação celular adequados sob o *scaffold*, é o tamanho dos poros. A distribuição uniforme e as interconexões dos poros são importantes para facilitar a formação de tecidos na forma de uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução tecidual (BAPTISTA; GUEDES, 2021; BRUNELLO et al., 2016).

Uma vez que os poros dos *scaffolds* desse trabalho não foram padronizados, isso pode ter tido influência na proliferação celular. Possivelmente se tivessem os poros com tamanhos adequados, entre 100 e 300 μ m (BAPTISTA; GUEDES, 2021), as células MC3T3-E1 poderiam ter uma viabilidade ainda melhor e conseqüentemente uma proliferação maior.

6.4. Adsorção da rhBMP-2

A imobilização de proteínas na superfície de materiais poliméricos requer a presença de grupos funcionais específicos, como a carboxila (ZHANG et al., 2007). Este processo é dependente da molhabilidade, da química de superfície e da topografia do substrato (ZHU et al., 2002). Sendo assim, a preparação da superfície de polímeros para a imobilização de proteínas, em geral, envolve a inserção destes grupos funcionais específicos (ZHU et al., 2004).

Neste presente trabalho, foi realizado, portanto, a modificação química dos *scaffolds* de PLA para uma maior adsorção da proteína rhBMP-2.

Os resultados obtidos pela adsorção da rhBMP-2 nos *scaffolds* de PLA com ou sem tratamento químico está demonstrado na tabela a seguir (**Tabela 2**). No qual demonstra que houve maior adsorção da rhBMP-2 no tratamento de

scaffolds com 0,25 M de NaOH, enquanto que na maior concentração de 1M a proteína não foi suficientemente adsorvida, podendo ser atribuído ao fato da tendência de saturação, ou seja, existe um ponto específico, determinável por isotermas de adsorção, onde não mais ocorre adsorção da proteína (MENDONÇA et al., 2009).

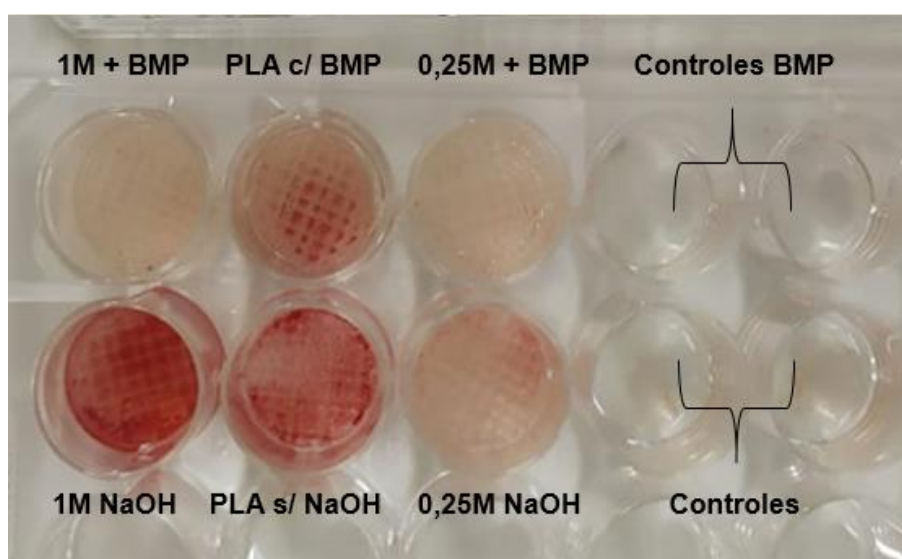
Tabela 2- Valores de adsorção da rhBMP-2 em *scaffolds* de PLA. *rhBMP-2 parcialmente purificada com concentração inicial de 0,825 mg/ml.

	PLA s/tratamento	PLA + 0,25M NaOH	PLA + 1M NaOH
Concentração rhBMP-2	0,112 mg/ml	0,252 mg/ml	0,141 mg/ml

6.5. Ensaio de síntese de matriz óssea por meio do método colorimétrico com vermelho de Alizarina

Os resultados do ensaio de mineralização se encontram na figura a seguir (**Fig. 11**), demonstrando uma maior mineralização no *scaffold* adsorvido apenas com a rhBMP-2, sem tratamento químico e com meio privado de soro. Mostrando que a adsorção de um *scaffold* somente com a proteína rhBMP-2 foi capaz de induzir matriz óssea, sem precisar de uma prévia modificação química. A imagem evidencia também que não há uma relação entre as concentrações adsorvidas da rhBMP-2 no PLA e a mineralização, já que na concentração de 0,25M onde a proteína foi melhor adsorvida houve menos mineralização.

Figura 11- Ensaio de síntese de matriz óssea. *Scaffolds* de cima representados pela associação da modificação com NaOH e adsorção com a rhBM-2 em meio privado de soro. *Scaffolds* de baixo tratados quimicamente com NaOH em meio de diferenciação (α -MEM suplementado com 10% SFB, 10 mM de β -glicofosfato, 01 mM de dexametasona e 50 mM de ácido ascórbico).



Entre os fatores de crescimento, a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) é um fator chave na indução da osteogênese e tem sido amplamente utilizada em abordagens de engenharia de tecidos para o reparo de lesões ósseas e defeitos ósseos (FU et al., 2017).

Muitos estudos relataram que materiais poliméricos incorporados com BMP-2 podem induzir significativamente a diferenciação osteogênica celular, bem como melhorar a formação óssea (TABATA, 2005; TAKAHASHI; YAMAMOTO; TAKEOKA et al., 2015; PARK et al., 2017).

Além disso, a BMP-2 foi aprovada pela FDA dos EUA para uso clínico para induzir a formação óssea por meio do aumento do recrutamento de células progenitoras de osteoblastos e angiogênese (SHEN et al., 2016).

O método convencional da combinação de BMP-2 em materiais poliméricos é a incorporação desses fatores aos materiais durante a fabricação desses. No entanto, como a fabricação de materiais poliméricos deve usar solventes orgânicos, a bioatividade do fator de crescimento será danificada ou reduzida (FU et al., 2017).

Comparado a esses métodos convencionais, o método de imobilização vem sendo utilizado. Mais recentemente, um grande número de métodos para a imobilização de fatores de crescimento foi avaliado. Esses métodos incluem tratamento com plasma, gelatina foto reativa, revestimento de poli (dopamina) e PLGA conjugado com heparina (SHEN et al., 2008; 2011; SUN; TAN, 2013; GAO et al., 2016;).

Alguns outros trabalhos também evidenciaram os efeitos da adsorção da rhBMP-2 em polímeros. Lee e colaboradores (1994) observaram que os osteoblastos cultivados sobre o PLGA adsorvido com a rhBMP-2, obtiveram uma maior produção de matriz óssea em relação aos controles. Experimento semelhante foi realizado por WHANG e colaboradores (1998).

Outro estudo feito de HOLLINGER e colaboradores (1998) onde a rhBMP-2 foi adsorvida a uma matriz de colágeno I. Quando essa matriz colagênica foi implantada em porções fraturadas de ossos, houve a neoformação de tecido ósseo bem como a integração do implante com o osso lesado.

GUGALA e colaboradores (2004) estudaram a adsorção de proteínas sobre a atividade de osteoblastos cultivados por até três semanas sobre

membranas porosas e não porosas de PDLA. Foi observado que a presença de poros não influenciou a adsorção protéica. Além disso, as células mantiveram o fenótipo de osteoblastos, foram capazes de formar nódulos de mineralização, e produzem fosfatase alcalina.

Entretanto, nenhum trabalho foi publicado ainda, associando a modificação química do polímero PLA e a funcionalização dele com a rhBMP-2. Como os resultados da adsorção da rhBMP-2 demonstraram, a proteína foi mais adsorvida em uma concentração (0,25M).

Entretanto, o ensaio de mineralização indica que a conformação adotada pela proteína rhBMP-2 na superfície do biomaterial sem tratamento químico, possui maior relevância para a bioatividade do que a quantidade adsorvida da proteína no biomaterial modificado quimicamente. Isso demonstra que a rhBMP-2 de fato, é um fator chave na indução da osteogênese, e que a adsorção da mesma ocorre mesmo sem o material ter sido modificado superficialmente para a introdução da hidrofiliabilidade e aumento da rugosidade.

7. Conclusões

- Scaffolds de PLA:

As caracterizações físico-químicas (FTIR-ATR e AFM) dos *scaffolds* tratados quimicamente com NaOH comprovaram a eficiência do tratamento alcalino demonstrado pelos sais de carboxilatos formados, além do surgimento dos grupos OH e aumento da rugosidade superficial.

- Ensaio de proliferação e viabilidade celular:

A modificação química dos *scaffolds* de PLA não alterou a viabilidade, sugerindo uma proliferação ao longo dos dias, das células MC3T3-E1.

- Adsorção da rhBMP-2 nos *scaffolds* de PLA modificados quimicamente ou não:

Houve adsorção da rhBMP-2 independente do tratamento, entretanto no PLA tratado com 0,25M de NaOH, a proteína adsorveu mais.

- Ensaio de síntese de matriz óssea:

O ensaio de mineralização demonstrou que a rhBMP-2 é um fator na indução da osteogênese, e que a adsorção dela ocorreu mesmo sem o material ter sido modificado superficialmente.

Referências bibliográficas

AGRAWAL, V.; SINHA, M. A review on carrier systems for bone morphogenetic protein-2. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 904–925, 2017.

ANDERSEN, T. L. et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. **American Journal of Pathology**, v. 174, n. 1, p. 239–247, 2009.

APPEL, A. A. et al. Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 34, n. 28, p. 6615–6630, 2013.

AVERYANOVA, M.; BERTRAND, P.; VERQUIN, B. Manufacture of Co-Cr dental crowns and bridges by selective laser Melting technology: This paper presents the successful application of the selective laser melting technology in dental frameworks manufacturing from Co-Cr alloy using Phenix PM 100T dental . **Virtual and Physical Prototyping**, v. 6, n. 3, p. 179–185, 2011.

BAČÁKOVÁ, L. et al. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. **Physiological Research**, v. 53, n. SUPPL. 1, 2004.

BAPTISTA, R.; GUEDES, M. Morphological and mechanical characterization of 3D printed PLA scaffolds with controlled porosity for trabecular bone tissue replacement. **Materials Science and Engineering C**, v. 118, n. August 2020, p. 111528, 2021.

BARUD, H. S. et al. Polylactic acid scaffolds obtained by 3D printing and modified by oxygen plasma. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 23, n. 1, p. 97–106, 2020.

BOERCKEL, J. D. et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 22, p. 5241–5251, 2011.

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012.

BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing. **Materials Today**, v. 16, n. 12, p. 496–504, 2013.

BRUNELLO, G. et al. Powder-based 3D printing for bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 740–753, 2016.

CARRINGTON, J. L. Aging bone and cartilage: Cross-cutting issues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 3, p. 700–708, 2005.

CHEN, B. Q. et al. Investigation of silk fibroin nanoparticle-decorated poly(L-lactic acid) composite scaffolds for osteoblast growth and differentiation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 1877–1890, 2017.

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3–4, p. 584–671, 2013.

CHIA, H. N.; WU, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2015.

CHOI, W. J. et al. Rapid development of dual porous poly(lactic acid) foam using fused deposition modeling (FDM) 3D printing for medical scaffold application. **Materials Science and Engineering C**, v. 110, n. January, p. 110693, 2020.

CLENDENIN, M. A. Dry floatation cushion. v. 62203, n. 618, p. 62203, 1978.

COLANGE, A. L. MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL PRODUÇÃO DA BMP-2 RECOMBINANTE DE HUMANO (rhBMP-2) ÓSSEO Araraquara-SP ANA LUCIA COLANGE PRODUÇÃO DA BMP-2 RECOMBINANTE DE HUMANO (rhBMP-2) Araraquara-SP. 2017.

CROCKETT, J. C. et al. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: Focus on the RANK/RANKL axis. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 2011.

CROLL, T. I. et al. Controllable surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 463–473, 2004.

D'HAESE, J. et al. Accuracy and Complications Using Computer-Designed Stereolithographic Surgical Guides for Oral Rehabilitation by Means of Dental Implants: A Review of the Literature. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 14, n. 3, p. 321–335, 2012.

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. **International Journal of Polymer Science**, v. 2011, n. ii, 2011.

DO, A. V. et al. 3D Printing of Scaffolds for Tissue Regeneration Applications. **Advanced Healthcare Materials**, v. 4, n. 12, p. 1742–1762, 2015.

DRIUSSI, B.; MATOS, M. Universidade de araraquara- uniara. 2017.

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1501–1504, 2000.

FERRONI, L. et al. A hyaluronan-based scaffold for the in vitro construction of dental pulp-like tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 4666–4681, 2015.

FLÜGGE, T. V. et al. Three-dimensional plotting and printing of an implant drilling guide: Simplifying guided implant surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 8, p. 1340–1346, 2013.

FU, C. et al. Enhancing Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Pre-osteoblasts by BMP-2 Delivery in Graphene Oxide-Incorporated PLGA/HA Biodegradable Microcarriers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

GAO, T. et al. Photo-immobilization of bone morphogenic protein 2 on PLGA/HA nanocomposites to enhance the osteogenesis of adipose-derived stem cells. **RSC Advances**, v. 6, n. 24, p. 20202–20210, 2016.

GAUTSCHI, O. P.; FREY, S. P.; ZELLWEGGER, R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. **ANZ Journal of Surgery**, v. 77, n. 8, p. 626–631, 2007.

GLOTZBACH, J. P. et al. Regenerative Medicine. **Current Problems in Surgery**, v. 48, n. 3, p. 148–212, 2011.

GREGOR, A. et al. Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–21, 2017.

GROTTKAU, B. E.; LIN, Y. Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. **Bone Research**, v. 1, n. 2, p. 133–145, 2013.

GUGALA, Z.; GOGOLEWSKI, S. Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts on polylactide membranes with defined surface characteristics. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2341–2351, 2004.

HAUGE EM, QVESEL D, ERIKSEN EF, MOSEKILDE L, M. F. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 9, p. 1575– 1582., 2001.

HOLLINGER, J. O. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 43, n. 4, p. 356–364, 1998.

HOLZWARATH, J. M.; MA, P. X. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 36, p. 9622–9629, 2011.

HUH, J. B. et al. Effect of rhBMP-2 immobilized anorganic bovine bone matrix on bone regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 16034–16052, 2015.

JACOBS, T. et al. Plasma surface modification of biomedical polymers: Influence on cell-material interaction. **Plasma Chemistry and Plasma Processing**, v. 32, n. 5, p. 1039–1073, 2012.

JORDÁ-VILAPLANA, A. et al. Surface modification of polylactic acid (PLA) by air atmospheric plasma treatment. **European Polymer Journal**, v. 58, p. 23–33, 2014.

JR, A. R. S.; WADA, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. v. 17, p. 308–317, 2007.

JUNG, T. et al. Effect of BMP-2 Delivery Mode on Osteogenic Differentiation of Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

KANG, Q. et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. **Gene Therapy**, v. 11, n. 17, p. 1312–1320, 2004.

KANG, W. et al. Sequential application of bFGF and BMP-2 facilitates osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 54, n. 4, p. 424–434, 2019.

KHOJASTEH, A. et al. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: A systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 6, p. 1–19, 2013.

KNESER, U. et al. Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 7–19, 2006.

KULINETS, I. **Biomaterials and their applications in medicine**. [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2015.

KURENOV, S. N. et al. Three-dimensional printing to facilitate anatomic study, device development, simulation, and planning in thoracic surgery. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 149, n. 4, p. 973- 979.e1, 2015.

LANE, N. E.; SILVERMAN, S. L. Anabolic therapies. **Current Osteoporosis Reports**, v. 8, n. 1, p. 23–27, 2010.

LEE, J. H. et al. The induction of bone formation in rat calvarial defects and subcutaneous tissues by recombinant human BMP-2, produced in *Escherichia coli*. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3512–3519, 2010.

LEE, S. C. et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 10, p. 1149–1156, 1994.

LEWIS, J. A. Direct ink writing of 3D functional materials. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 17, p. 2193–2204, 2006.

LI, X. et al. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 8, p. 2424–2435, 2013.

LIAW, C. Y.; GUVENDIREN, M. Current and emerging applications of 3D printing in medicine. **Biofabrication**, v. 9, n. 2, 2017.

LIU, M. et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. **Bone Research**, v. 5, n. January, 2017.

LIU, Y.; LIM, J.; TEOH, S. H. Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 5, p. 688–705, 2013.

MA, Z.; MAO, Z.; GAO, C. Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, n. 2, p. 137–157, 2007.

MALDA, J. et al. 25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication. **Advanced Materials**, v. 25, n. 36, p. 5011–5028, 2013.

MALONE, E.; LIPSON, H. Fab±Home: The personal desktop fabricator kit. **Rapid Prototyping Journal**, v. 13, n. 4, p. 245–255, 2007.

MARDEN, L. J. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 is superior to demineralized bone matrix in repairing craniotomy defects in rats. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 28, n. 10, p. 1127–1138, 1994.

MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 98–105, 2008.

MARQUIS, M. et al. contain capillaries , nerves and connective tissue . These canals run parallel and are separated by transverse Volkmann ' s canals (18 , 20). Trabecular bones are found mainly in the spine , flat bones , short bones and in the extremities of long bones . **Life Sciences**, p. 1023–1067, 2009.

MARTIN, T. J.; SEEMAN, E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 701–722, 2008.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 201–209, 2008.

MENDONÇA, R. H. et al. Adsorção de fibronectina a arcabouços de polihidroxibutirato aplicáveis à engenharia óssea. **Polímeros**, v. 19, n. 2, p. 143–148, 2009.

MOHD SABEE, M. M. S. et al. Characterization and in vitro study of surface modified PLA microspheres treated with NaOH. **Journal of Polymer Materials**, v. 33, n. 1, p. 191–200, 2016.

MONTANARI, T. **Histologia: Texto, atlas e roteiro para aulas práticas.** [s.l: s.n.].

MOSTAFA, N. Z. et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured with dexamethasone, vitamin D3, basic fibroblast growth factor, and bone morphogenetic protein-2. **Connective Tissue Research**, v. 53, n. 2, p. 117–131, 2012.

MOURA, L. M. D. E.; SUYANTO, A. H. **No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title.** [s.l: s.n.].

MOURIÑO, V.; BOCCACCINI, A. R. Bone tissue engineering therapeutics: Controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 209–227, 2010.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773–785, 2014.

NOR, Y. A. et al. Shaping nanoparticles with hydrophilic compositions and hydrophobic properties as nanocarriers for antibiotic delivery. **ACS Central Science**, v. 1, n. 6, p. 328–334, 2015.

OLIVEIRA, A. C. S. DE; BORGES, S. Poli (Ácido Láctico) Aplicado para Embalagens de Alimentos : Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2020.

ORYAN, A. et al. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. Journal of orthopaedic surgery and research. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 9, n. 1, p. 1–27, 2014.

OZBOLAT, I. T. Scaffold-Based or Scaffold-Free Bioprinting: Competing or Complementing Approaches? **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, v. 6, n. 2, 2015.

PARK, H. et al. Three-dimensional constitutive model for shape memory polymers using multiplicative decomposition of the deformation gradient and shape memory strains. **Mechanics of Materials**, v. 93, p. 43–62, 2016.

PARK, S. et al. Improved Bone Regeneration with Multiporous PLGA Scaffold and BMP-2-Transduced Human Adipose-Derived Stem Cells by Cell-Permeable Peptide. **Implant Dentistry**, v. 26, n. 1, p. 4–11, 2017.

PHAN, T. C. A.; XU, J.; ZHENG, M. H. Phan-1325-1344-2004. p. 1325–1344, 2004.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: Tipos, aplicações e mercado. **Quimica Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PRABHAKARAN, M. P. et al. Stem cells and nanostructures for advanced tissue regeneration. **Advances in Polymer Science**, v. 246, n. 1, p. 21–62, 2012.

RAYNA, T.; STRIUKOVA, L. Adaptivity and Rapid Prototyping: How 3D Printing Is Changing Business Model Innovation. p. 167–182, 2016.

RIPAMONTI, U.; REDDI, A. H. **Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins** *Journal of Periodontal Research*, 1994.

ROACH, P. et al. Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 18, n. 7, p. 1263–1277, 2007.

ROCHA VALADAS MARQUES, L. A. et al. Application of BMP-2 for bone graft in Dentistry. **Rsbo**, v. 12, n. 1, p. 88, 2016.

RODRIGUES, I. C. P. et al. Cardiac tissue engineering: current state-of-the-art materials, cells and tissue formation. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 16, n. 3, p. eRB4538, 2018.

RONGA, M. et al. Clinical applications of growth factors in bone injuries: Experience with BMPs. **Injury**, v. 44, n. SUPPL.1, p. S34–S39, 2013.

SAHNI, V. et al. The Role of Tissue Engineering in Achilles Tendon Repair: A Review. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2014.

SANTOS MIRANDA, M. E. et al. I . The role of N-carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dynamic. **Polym Int**, v. 55, n. July, p. 961–969, 2006.

SCHNEIDER, M. et al. Surface etching of 3D printed poly(lactic acid) with NaOH: A systematic approach. **Polymers**, v. 12, n. 8, 2020.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 34, n. 4–5, p. 147–230, 2001.

SEEMAN, E. Bone quality: The material and structural basis of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2008.

SHEN, H. et al. The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide). **Biomaterials**, v. 29, n. 15, p. 2388–2399, 2008.

SHEN, H. et al. Cell affinity for bFGF immobilized heparin-containing poly(lactide-co-glycolide) scaffolds. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3404–3412, 2011.

SHEN, X. et al. Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. **Biomaterials**, v. 106, p. 205–216, 2016.

SHUANG, Y. et al. In vitro characterization of an osteoinductive biphasic calcium phosphate in combination with recombinant BMP2. **BMC Oral Health**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2016.

SIGURDSSON, T. J. et al. Periodontal Repair in Dogs: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Significantly Enhances Periodontal Regeneration. **Journal of Periodontology**, v. 66, n. 2, p. 131–138, 1995.

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 5, p. 444–451, 2008.

SOBACCHI, C. et al. Osteopetrosis: Genetics, treatment and new insights into osteoclast function. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 9, p. 522–536, 2013.

STEVE UPCRAFT; RICHARD FLETCHER. The rapid prototyping technologies. **Assembly Automation**, v. 23, n. 4, p. 318–330, 2003.

SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1285–1309, 2013.

TAKAHASHI, Y.; YAMAMOTO, M.; TABATA, Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. **Biomaterials**, v. 26, n. 23, p. 4856–4865, 2005.

TAKEOKA, Y. et al. In situ preparation of poly(l-lactic acid-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites as artificial bone materials. **Polymer Journal**, v. 47, n. 2, p. 164–170, 2015.

TANG, W. et al. Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect. **Acta Biomaterialia**, v. 32, p. 309–323, 2016.

THAM, C. Y. et al. Surface engineered poly (lactic acid) (PLA) microspheres by chemical treatment for drug delivery system. **Key Engineering Materials**, v. 594–595, p. 214–218, 2014.

TRAINI, T. et al. Direct laser metal sintering as a new approach to fabrication of an isoelastic functionally graded material for manufacture of porous titanium dental implants. **Dental Materials**, v. 24, n. 11, p. 1525–1533, 2008.

WANG, S.; CUI, W.; BEI, J. Bulk and surface modifications of polylactide. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 3, p. 547–556, 2005.

WANG, X. et al. Decoupling polymer properties to elucidate mechanisms governing cell behavior. **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 18, n. 5, p. 396–404, 2012.

WHANG, K. et al. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 42, n. 4, p. 491–499, 1998.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

WONG, K. V.; HERNANDEZ, A. A Review of Additive Manufacturing. **ISRN Mechanical Engineering**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

WOZNEY, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 2, p. 160–167, 1992.

XIAO, L. et al. **Poly (Lactic Acid) -Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications**. [s.l: s.n.].

XIAO, Y. T.; XIANG, L. X.; SHAO, J. Z. Bone morphogenetic protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 3, p. 550–553, 2007.

YAMAGUCHI, M. et al. Surface modification of poly(L-lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth. **Journal of Artificial Organs**, v. 7, n. 4, p. 187–193, 2004.

YU, N. Y. C. et al. Biodegradable poly(α -hydroxy acid) polymer scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 93, n. 1, p. 285–295, 2010.

ZHANG, H. et al. Optimized procedure for expression and renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentrations. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 7, p. 3089–3095, 2010.

ZHANG, Y. et al. Fibronectin immobilized by covalent conjugation or physical adsorption shows different bioactivity on aminated-PET. **Materials Science and Engineering C**, v. 27, n. 2, p. 213–219, 2007.

ZHU, W. et al. 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 40, p. 103–112, 2016.

ZHU, Y. et al. Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 6, p. 1312–1319, 2002.

ZHU, Y. et al. Immobilization of Biomacromolecules onto Aminolyzed Poly(L-lactic acid) toward Acceleration of Endothelium Regeneration. **Tissue Engineering**, v. 10, n. 1–2, p. 53–61, 2004.