



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**REBECA PEREIRA BULHOSA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS EM  
BIOMATERIAIS (PLA, PC-ISO, ABS M30i)**

Salvador - BA  
Dezembro, 2023

**REBECA PEREIRA BULHOSA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS EM  
BIOMATERIAIS (PLA, PC-ISO, ABS M30i)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Soraya Castro Trindade

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Miranda Lopes Falcão

Salvador – BA  
Dezembro, 2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

<p>S237 Santos, Rebeca Pereira Bulhosa</p> <p>Avaliação da expressão gênica de osteoblastos cultivados em biomateriais</p> <p>(PLA, PC-ISO, ABS M30i)/Rebeca Pereira Bulhosa Santos. – Salvador, 2023.</p> <p>62 f.: il.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Soraya Castro Trindade; Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michelle Miranda Lopes Falcão.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.</p> <p>Inclui referências e apêndice.</p>
---



Nº17D/2023

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE INTITULADO: “Avaliação da expressão gênica de osteoblastos produzidos em biomateriais (ABS M30i, PC ISO, PLA)” DA DOUTORANDA REBECA BULHOSA SANTOS.

Aos quinze dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte três, na sala de reunião virtual da plataforma Google Meet, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Soraya Castro Trindade (orientadora); Dr. Lucas Novaes Teixeira; Dr. Paulo José Lima Juiz; Dr. Antônio Pedro Frões de Farias e Dra. Valdirene Leão Carneiro se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de tese intitulado: “Avaliação da expressão gênica de osteoblastos produzidos em biomateriais (ABS M30i, PC ISO, PLA)” da doutoranda Rebeca Bulhosa Santos. Após a apresentação, arguição e comentários dos membros da Banca Examinadora fica determinado que as sugestões discutidas sejam implementadas na versão final da tese. Havendo cumprido as exigências do Programa quanto à defesa do trabalho final, a Banca Examinadora conclui que mediante a entrega do exemplar final pela aluna com as devidas modificações no prazo de 60 dias, a Pós-Graduanda está habilitada à obtenção do título de Doutora em Imunologia. Adicionalmente, os pareceres individuais dos membros da Banca Examinadora serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar se encerra a sessão da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela doutoranda Rebeca Bulhosa Santos e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Imunologia da UFBA. Salvador, quinze de dezembro de dois mil e vinte três.

*Soraya Castro Trindade*  
Dra. Soraya Castro Trindade  
Orientadora

*Antônio Pedro Frões de Farias*  
Dr. Antônio Pedro Frões de Farias  
Banca Examinadora

Dra. Valdirene Leão Carneiro  
Banca Examinadora

gov.br  
Documento assinado digitalmente  
VALDIRENE LEÃO CARNEIRO LIMA  
Data: 20/12/2023 15:53:16-0900  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Sílvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm  
ICS-UFBA

*Lucas Novaes Teixeira*  
Dr. Lucas Novaes Teixeira  
Banca Examinadora

*Paulo José Lima Juiz*  
Dr. Paulo José Lima Juiz  
Banca Examinadora

*Rebeca Bulhosa Santos*  
Rebeca Bulhosa Santos.  
Doutoranda

*À você meu filho, Ethan, eu dedico esse trabalho, você foi um milagre gerado em meio à essa pesquisa que foi bastante desafiadora, mas também muito gratificante!!*

## **AGRADECIMENTOS**

Meu primeiro agradecimento à Deus, porque Dele, por Ele, para Ele são todas as coisas, aquele que permitiu que eu chegasse até aqui e meu deus forças para concluir, meu socorro bem presente, minha torre forte, meu Deus, meu Pai, meu Criador!

À minha família formada, meu esposo e meu filho, meu maiores incentivadores, meus amores, minha vida! À minha família de berço, meus pais que até hoje fazem de tudo para que eu realize meus sonhos e vibram com as minhas conquistas. Meus irmãos Rapha e Mila por serem meu apoio incondicional, sou louca por vocês. Minha vó, nossa coluna, nossa referência, minha gratidão eterna, te amo!

À minha família, onde o sangue não importa, e sim o que sentimos, minha pró, mãe e orientadora Soraya, só eu sei o que és pra mim, aqui eu NUNCA conseguiria agradecer, te amo infinitamente! Silvania, Michelle e Patricia eu não sei o que faria sem vocês, obrigada por existirem na minha vida! Raquel, Ravena, Amanda e Denise são parte de mim, obrigada por absolutamente TUDO!

A de sempre e para sempre minha psi/amiga MARIIIIIIII, eu consegui!!!!!! Obrigada amor meu, por estar presente em todas as etapas da minha vida desde 2008!

Aos meus amigos, Geraldo e Mila, Fernanda (palavras não expressam minha gratidão por todo apoio e suporte), Ana Paula, Yuri, vocês foram e são essenciais na minha vida! Aos meus sogros e cunhadas, amo vocês!

A parceria que deu mais que certo, Bruno, Rogério, Prof Lucas e Fróes, é agradecimento e perdão... srsrrsrs... quem me conhece sabe o quanto que consigo ser absurdamente chata quando quero/preciso de alguma coisa... srsrsr... obrigada, vocês são incríveis!! Aos amigos que a UNIFACS me proporcionou... Anny, Jessica e João...Obrigada por tornar essa caminhada mais leve!

Ao NUPPIIM, ao Labimuno, Janaína e Antonio (me ajudaram muito na finalização da tese) e a todos que fazem parte desses grupos, é aqui que crescemos e aprendemos! A CAPES, PPGIM, UEFS e UFBA por me fornecerem todo suporte para realizar essa pesquisa. E a todos que eu não citei aqui, mas que fazem e fizeram parte desse momento da minha vida! MUITO OBRIGADA!

*“Mude o modo que você olha para as coisas, e as coisas que você olha  
mudarão”.*

*Wayne Dyer*

## RESUMO

Algumas lesões orofaciais estão relacionadas à perda da continuidade óssea e, conseqüentemente, a danos estruturais e funcionais que prejudicam a qualidade de vida. A produção de tecidos biológicos a partir de culturas celulares é sugerida como estratégia auxiliar para cirurgias reconstrutivas orofaciais, porém, a eficácia da técnica depende de uma estrutura de suporte que oriente a formação de tecidos funcionais de acordo com o leito receptor. Nesse contexto, foi investigada a assinatura de expressão gênica de células osteoblásticas (SAOS-2) cultivadas em 5 e 10 dias em matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional. Para isso, os osteoblastos cultivados em arcabouço de policarbonato de ácido polilático (PLA), Policarbonato-ISO (PC-ISO) e acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS M30i) foram avaliados pelo sistema Array Real Time PCR para determinar a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, mineralização óssea, ossificação, fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na inflamação e cicatrização. Os resultados obtidos revelaram que os arcabouços do PLA destacando-se os genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *spp1*, *minpp1*, *ibsp*, *fgf2*, *tgfb2*, *smad1*, *smad5*, *smad4*, *bmpr1* e *fgr1*, do PC-ISO com destaque nos genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad1*, *runx2*, *bmPr1a* e *Fgfr*, e do ABS-M30i, com destaque nos genes *bmp5*, *bmp6*, *col9A2*, *col11A1*, *spp1*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad4*, *smad9*, *runx2* / *bmpr1A*, *fgfr1* e *Igfr1*, permitem a expressão de grande parte de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, no entanto o PLA parece ter permitido a expressão de forma mais exuberante nos genes que foram destacados, e o PC-ISO permitiu uma resposta global mais uniforme. Assim, a utilização dos três biomateriais na engenharia tecidual torna-se promissora.

**Palavras-chave:** expressão gênica, osteoblastos, scaffolds, engenharia tecidual, biomateriais.



## ABSTRACT

Some orofacial injuries are related to the loss of bone continuity and, consequently, to structural and functional damage that impair quality of life. The production of biological tissues from cell cultures is suggested as an auxiliary strategy for orofacial reconstructive surgeries, but the effectiveness of the technique depends on a support structure that guides the formation of functional tissues according to the receptor bed. In this context, the gene expression signature of osteoblastic cells (SAOS-2) cultured on 5 and 10 days in rigid matrices produced with a three-dimensional printer was investigated. To this end, osteoblasts cultured on polylactic acid polycarbonate (PLA), acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS M30i) and Polycarbonate-ISO (PC-ISO) scaffolds were evaluated by Array Real time PCR system to determine the expression of genes related to osteoblastic differentiation, bone mineralization, ossification, growth factors, and transcription factors involved in inflammation and healing. The results obtained showed that the ABS-M30i scaffolds, with emphasis on the genes *bmp5*, *bmp6*, *col9A2*, *col11A1*, *spp1*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad4*, *smad9*, *runx2* / *bmpr1A*, *fgfr1* and *lgfr1*, the PC-ISO with emphasis on in the genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad1*, *runx2*, *bmPr1a* and *Fgfr* and the PLA, highlighting the genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *spp1*, *minpp1*, *ibsp*, *fgf2*, *tgfb2*, *smad1*, *smad5*, *smad4*, *bmpr1* and *fgr1*, allow the expression of a large number of genes responsible for bone formation *in vitro*, however, PLA seems to have allowed more exuberant expression in the genes that were highlighted, and PC-ISO allowed a more uniform overall response. Thus, the use of the three biomaterials in tissue engineering becomes promising.

**Keywords:** gene expression, osteoblasts, scaffolds, tissue engineering and biomaterials.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1 Geral .....	12
2.2 Específicos .....	12
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
3.1 Tecido ósseo .....	13
3.2 Genes envolvidos na osteogênese .....	16
3.3 Engenharia tecidual.....	19
3.4 Biomateriais .....	23
3.5 Bioimpressoras e tecnologia de impressão 3-D .....	24
<b>4 MANUSCRITO 01</b> .....	<b>25</b>
4.1 Introdução .....	26
4.2 Material e métodos .....	27
4.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR .....	28
4.2.2 Análise estatística .....	28
4.3 Resultados .....	29
4.4 Discussão.....	30
4.5 Conclusão .....	32
Referências.....	32
<b>5 MANUSCRITO 02</b> .....	<b>35</b>
5.1 Introdução .....	35
5.2 Material e métodos .....	36
5.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR .....	37
5.2.2 Análise dos dados.....	37
5.3 Resultados .....	38
5.4. Discussão.....	40
5.5 Conclusão .....	42
Referências.....	42
<b>6 MANUSCRITO 03</b> .....	<b>43</b>
6.1 Introdução .....	44
6.2 Material e métodos .....	45
6.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR .....	46
6.2.2 Análise dos dados.....	46
6.3 Resultados .....	46
6.4 Discussão.....	49
6.5 Conclusão .....	510
Referências.....	51
<b>7 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
<b>APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR</b> .....	<b>62</b>

## APRESENTAÇÃO

Inúmeras condições podem resultar na deterioração do tecido ósseo, gerando defeitos craniofaciais que impactam negativamente na qualidade de vida das pessoas. Já existem tratamentos eficazes para defeitos pequenos, mas em casos de defeitos de grande porte, é necessário buscar métodos de reconstrução óssea mais abrangentes. Nesse sentido, a engenharia de tecidos mostra-se promissora, utilizando biomateriais, que são usados para fornecer um arcabouço para o crescimento de células ósseas.

Diante da relevância desse tema, surgiu a ideia de investigar o comportamento de osteoblastos (células SAOS-2) cultivados em presença de três biomateriais candidatos em potencial a arcabouços para reconstrução óssea: policarbonato de ácido polilático (PLA), acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS M30i) e o policarbonato biocompatível, em conformidade com a ISO 10993 e Classe USP VI (PC-ISO). Estudos prévios do grupo demonstraram que os três materiais permitiram de forma semelhante a viabilidade celular, a mineralização da matriz extracelular e, em graus diferentes, a proliferação celular e a atividade da fosfatase alcalina. Esses dados foram apresentados em duas dissertações de mestrado e estão em fase de submissão para publicação.

Como continuidade a essa linha de pesquisa, com grande potencial de inovação tecnológica, o presente estudo buscou, nestes mesmos osteoblastos, fazer uma investigação da expressão de conjuntos de genes relacionados a proteínas envolvidas na diferenciação osteoblástica, mineralização óssea, ossificação, fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na inflamação e cicatrização.

Esse projeto contou com a participação de pesquisadores do Instituto Federal da Bahia (IFBA)-Campus Salvador, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA), do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic e do Núcleo de Pesquisa, Prática Integrada e Investigação Multidisciplinar (NUPPIIM), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

O trabalho ora apresentado está dividido em seções de acordo com objetivo específico proposto. Assim, é apresentada inicialmente uma revisão geral da literatura e em seguida, três capítulos abordam sobre os três tipos de biomateriais utilizados.

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo orofacial é um tecido ósseo que se encontra na cavidade oral e em toda face, responsável por fornecer suporte e proteção para os dentes, músculos e tecidos da região. A perda desse tecido ósseo, decorrente do processo fisiológico de envelhecimento celular, de lesões associadas a traumas ou até mesmo de doenças associadas ao estímulo dos osteoclastos e osteoblastos, está relacionada à ocorrência de problemas funcionais e estéticos, conseqüentemente, à redução da qualidade de vida. Essa situação tem motivado a busca por terapias que visam recuperar a estrutura óssea perdida (MINUTTI *et al.*, 2019; Marie, 2015).

Diversas técnicas têm sido empregadas com a finalidade de reconstruir o tecido ósseo, como o enxerto autógeno, enxerto homogêneo, xenógeno e materiais aloplásticos. Entretanto, as limitações de cada uma dessas técnicas dificultam a reconstrução anatômica dos tecidos ósseos perdidos, principalmente, quando há grandes perdas de estrutura tecidual. Além disso, alguns fatores podem interferir na formação e manutenção do tecido ósseo, como a topografia e rugosidade da superfície, a biocompatibilidade e as condições de carga (CHAVDA e LEVIN, 2018; URBAN e MONJE, 2019).

Atualmente, o padrão ouro utilizado para tratar grandes defeitos ósseos é o enxerto autógeno, devido a rapidez da osseointegração. No entanto, existem alguns fatores limitantes à técnica, como a quantidade limitada de osso de algumas regiões doadoras e uma maior morbidade, ou seja, é necessário um leito ósseo hospedeiro saudável e compatível que permita a estabilidade primária e, conseqüentemente, a osseointegração (MARTIN *et al.*, 2019).

A engenharia do tecido ósseo é uma possibilidade ao uso de enxertos, evitando a morbidade dos doadores, a deformidade de crescimento e a reabsorção óssea. Os materiais usados na engenharia tecidual são chamados de biomateriais, eles podem fornecer propriedades biomecânicas funcionais, interações biomecânicas e biológicas entre células, cujos arcabouços podem ter uma influência significativa bem sucedida a longo prazo nos tecidos manipulados. Sua utilização é vantajosa, visto que são fabricados sob condições controladas, suas composições químicas são bem conhecidas e os materiais estão disponíveis em qualquer tempo e quantidade (PRAFULLA *et al.*, 2020).

Alguns biomateriais são grandes aliados na engenharia tecidual, como o ácido

poliláctico (PLA), que é um polímero de origem natural, tem mostrado seu valor por ser biocompatível, biodegradável e atóxico. Assim como, o policarbonato-ISO (PC-ISO), que também é polímero termoplástico, não tóxico e biocompatível é um material indicado para diversas finalidades médicas. E o acrilonitrila butadieno estireno (ABS), que é uma resina termoplástica obtida a partir do petróleo, não apenas exhibe biocompatibilidade, mas também demonstra resistência ao impacto e rigidez, sendo amplamente empregado em setores como a indústria farmacêutica e médica (YU *et al.*, 2018).

Alguns instrumentos são utilizados na engenharia tecidual, os arcabouços, por exemplo, são matrizes extracelulares transitórias que possuem a função de “arcabouço”, servindo como suporte para que células e vasos possam crescer e desenvolver suas funções no processo de revascularização. O uso de arcabouços em 3D juntamente com células fornecem suporte estrutural para que essas possam aderir, proliferar e se diferenciar formando novos tecidos (NETO; FERREIRA, 2018). A estrutura dos poros no espaço 3D garante a conectividade interna dos arcabouços associando os materiais biológicos (ZHOU *et al.*, 2020).

No contexto da formação do tecido ósseo, é necessário observar se os osteoblastos cultivados em arcabouços possuem a capacidade de promover o reparo tecidual, visto que sintetizam os componentes orgânicos da matriz óssea e participam da mineralização da matriz extra-celular. Com esse propósito, esse trabalho buscou investigar o conjunto de expressão gênica por arranjo RT-PCR de osteoblastos cultivados em matriz rígida produzida com impressora tridimensional.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- ✓ Investigar o arranjo de expressão gênica de osteoblastos cultivados em matriz rígida produzida com impressora tridimensional.

### **2.2 Específicos**

- ✓ Descrever a expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos cultivados em polímeros de PLA.
- ✓ Avaliar o conjunto de expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos cultivados no Policarbonato-ISO.
- ✓ Examinar a expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos cultivados em polímeros de ABS M30i.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, mineralizado, cuja matriz extracelular é calcificada, apresentando como funções, proteção dos órgãos vitais (medula e cérebro), suporte e local de fixação para os músculos. Além disso funciona como órgão metabólico que atua na hematopoiese e na homeostase mineral, atuando como um reservatório de minerais (SOFIA-NETO e FERREIRA; 2018).

É composto de partes orgânica e inorgânica. A parte orgânica é constituída por aproximadamente 10% de células e 30% de proteínas colágenas (PC) e não colágenas (PNC), e de uma pequena fração de lipídios e glicosaminoglicanos. A parte inorgânica representa aproximadamente 60% do tecido e é composta principalmente por cristais a base de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (CARVALHO *et al.*, 2018).

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura complexa formada sobretudo por colágenos, onde aproximadamente 88% da matriz é composta por colágeno tipo I. Este possui efeitos em funções importantes sobre células ósseas, incluindo apoptose, proliferação celular e diferenciação mediadas por receptores presentes na superfície das células (MURSHED; 2018).

Existem diferentes tipos de células no tecido ósseo, como os osteócitos, osteoclastos e células osteoprogenitoras, que são células mesenquimais as quais possuem a capacidade de se diferenciar em osteoblastos. As células osteoprogenitoras contribuem para a ampliação da população de osteoblastos no tecido ósseo, sendo encontradas em quase todas as superfícies expostas dos ossos, incluindo o endóstio, perióstio e as trabéculas de cartilagem calcificada (ROSS e PAWLINA; 2018).

Osteoblastos são células formadoras do tecido ósseo responsáveis pela síntese e secreção da matriz orgânica do osso no decorrer do crescimento ósseo e na reparação de lesões ósseas. Quando circundados por essa matriz, se diferenciam em osteócitos. São células jovens e metabolicamente ativas que sintetizam uma matriz orgânica composta principalmente de colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanos, também são responsáveis pela mineralização da matriz, que ocorre pela deposição de íons de fosfato de cálcio. Morfologicamente, os osteoblastos são células cúbicas

ou cilíndricas que residem na superfície do osso, principalmente no perióstio e no endóstio, desempenham um papel importante na regeneração óssea, participando do reparo de fraturas. Durante a síntese de matriz, os osteoblastos apresentam uma intensa basofilia, que é uma afinidade por corantes básicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO; 2017).

Os osteócitos são células que se originam a partir dos osteoblastos quando estes são envolvidos pela matriz óssea. A síntese protéica dos osteoblastos diminui quando eles se tornam osteócitos e o citoplasma torna-se menos basofílico. Os osteócitos residem em pequenas cavidades no interior da matriz óssea denominadas lacunas. A partir dessas lacunas, estendem seus prolongamentos celulares para se conectarem uns aos outros por meio de junções comunicantes que permitem a transferência de moléculas e íons entre eles. Além disso, desempenham papel fundamental na preservação da integridade da matriz óssea, participando da manutenção da matriz, da regulação do metabolismo mineral, agindo na ativação das células de revestimento da superfície em resposta a estímulos bioquímicos (TRESGUERRES *et al.*, 2020)

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas da fusão de células precursoras que provêm da medula óssea. Atuam na reabsorção e remodelação da matriz óssea, em ação coordenada com os osteoblastos. Em osteoclastos jovens, o citoplasma é levemente basofílico, mas torna-se acidofílico à medida que a célula amadurece. A atividade enzimática dos osteoclastos promove a escavação da matriz óssea, formando depressões conhecidas como lacunas de Howship (MURSHED; 2018).

As superfícies internas e externas dos ossos são revestidas por duas membranas de tecido conjuntivo denominadas endóstio e o perióstio. O endóstio é uma membrana fina que reveste a superfície interna do osso. É composto por células osteoprogenitoras que revestem as cavidades do osso esponjoso, o canal medular e os canais de Havers e de Volkmann. O perióstio contém vasos sanguíneos e linfáticos que fornecem nutrientes e oxigênio ao osso, além disso, é fonte de novos osteoblastos. Ele é composto por uma camada externa de fibras colágenas e fibroblastos e uma camada interna mais celular de células osteoprogenitoras. As células osteoprogenitoras do perióstio e do endóstio são essenciais para o crescimento e a recuperação óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO; 2017).

O tecido ósseo primário, também conhecido como tecido primordial, é o

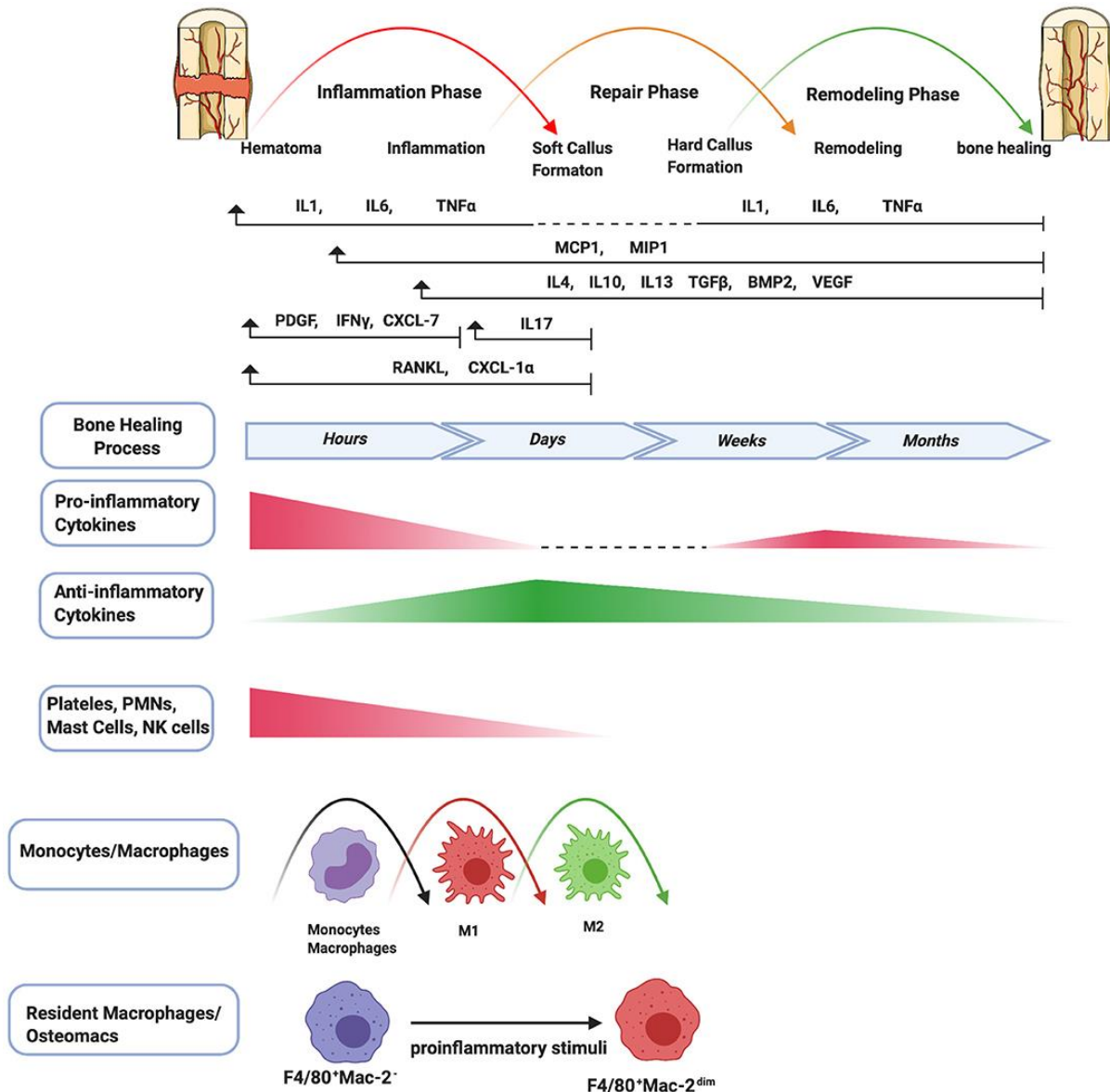


primeiro tecido ósseo a se formar, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto nos processos de reparação de fraturas. Ele é caracterizado por uma organização irregular das fibras colágenas, que não apresentam uma orientação definida, diferente do tecido ósseo secundário que é caracterizado por uma organização regular das fibras colágenas, que se dispõem em lamelas, formando uma estrutura altamente organizada. Em cada osso, o tecido ósseo primário é gradualmente substituído pelo tecido ósseo secundário (ROSS e PAWLINA; 2018).

Em regiões de fratura óssea, é observada a ocorrência de hemorragia devido à lesão dos vasos sanguíneos, levando à degradação da matriz e à mortalidade das células ósseas, seguido ao processo de regeneração e reparo, na qual corresponde a algumas fases. A fase inicial é a inflamatória (figura 1) que envolve a secreção do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-11 e IL-18. Quando ocorre um trauma, o local da fratura torna-se hipóxico e os osteócitos nas extremidades dos locais da fratura são privados da nutrição e sofrem transformações degenerativas e necróticas e ocorre a liberação de fatores osteoclastogênicos pelo osteócito como por exemplo o RANKL. Os macrófagos fagocitam as áreas necróticas e liberam alguns fatores de crescimento responsáveis pela migração, recrutamento e proliferação de células-tronco mesenquimais e sua diferenciação em angioblastos, condroblastos, fibroblastos e osteoblastos (URBAN e MONJE; 2019).

Após a etapa inflamatória, existe a fase proliferativa ou fase da fibroplasia, onde se inicia a reabsorção do osso necrótico, realizada pelos osteoclastos, onde há um aumento da angiogênese, apontando a presença de fibras colágenas e deposição do material osteóide, que é gradualmente substituído por osso imaturo. Em seguida, a mineralização, em que a comunicação entre osteoblastos e osteoclastos conduz o ciclo de remodelação óssea dentro de uma unidade multicelular básica. Finalmente, o osso é restaurado à sua força e estrutura originais, proporcional às cargas habituais colocadas nele (WANG *et al.*, 2022).

**Figura 1.** Visualização dos estágios da cicatrização óssea, mostrando o papel das células imunes e citocinas fatores de crescimento ao longo do tempo.



Fonte: MARUYAMA *et al.*, 2020.

### 3.2 Genes envolvidos na osteogênese

Vários genes codificam proteínas que estão envolvidas na formação óssea e o estudo da expressão gênica tem sido uma ferramenta valiosa para a compreensão do desenvolvimento deste tecido, bem como da patogênese de diversas condições a ele relacionadas. Nesta perspectiva, serão mencionadas neste tópico, algumas proteínas relacionadas à osteogênese, como genes da superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, BMP), receptores, colágenos, fatores de crescimento, fatores de transcrição, entre outros, cuja expressão gênica será avaliada no contexto desta pesquisa.

Alguns genes compreendem a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês, BMP), tendo como representantes as BMP 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. São proteínas não colagênicas de baixo peso molecular, com capacidade de estimular diferenciação das células mesenquimais em células osteogênicas, evento conhecido como osteoindução, além de exercer funções cruciais de osteogênese e condrogênese. Quando implantadas em sítios extra-ósseos são capazes de iniciar a neoformação óssea (JIABING *et al.*, 2023).

A BMP1 se diferencia um pouco das demais por ser uma metaloprotease que ajuda na regulação da formação da matriz extracelular (MEC), enquanto as outras são consideradas fatores de crescimento da superfamília TGF-beta, que promovem cicatrização óssea e auxiliam em vários processos como a osteogênese (YIFAN *et al.*, 2023).

Algumas proteínas também como as fosfatases, são fundamentais, pois o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é essencial para o controle de diversos eventos biológicos, sendo encarregadas da regulação de vários processos celulares como sinalizações metabólicas, comunicação, crescimento e proliferação celular. As fosfatases também possuem um papel bastante relevante na mineralização do esqueleto (ANTJE, 2019).

A fosfatase alcalina (ALPL), é capaz de hidrolisar difosfato extracelular em fosfato, proporcionando assim a formação de cristais de hidroxiapatita, além de atuar no metabolismo ósseo, possui capacidade de mineralização dos osteoblastos, agindo no controle da concentração dos inibidores da mineralização, mediante ao aumento da concentração local de íons fosfato, removendo o fosfato de outras proteínas. O múltiplo inositol polifosfato fosfatase 1 (MINPP1) atua na ossificação endocondral (COZZA *et al.*, 2018).

Ademais, os receptores são indispensáveis, pois são basicamente o sistema de comunicação entre as células, se ligam a substâncias específicas e respondem a forças intermoleculares causadas pela aproximação de hormônios e neurotransmissores (mensageiros químicos), sendo importantes em todo processo de formação óssea, como o receptor de proteína morfogenética óssea tipo IA (BMPRII), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR) 1, 2, 3, receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1R), receptores TGF-beta (TGFBRI) 1 e 2 e o receptor de vitamina D (VDR) (ARK *et al.*, 2018).

Os fatores de crescimento estimulam a proliferação celular mediante a regulação do ciclo do mesmo, dando início a mitose, estimulando a migração, sobrevivência, diferenciação celular e apoptose. Atuam também no processo de angiogênese, sendo fundamentais para diversos tecidos do corpo humano, visto que a neoformação vascular, assim como a reorganização da microcirculação, são imprescindíveis para o reparo ósseo e preservação da massa óssea neoformada, uma vez que esse processo de microcirculação permite a regulação da temperatura e liberação de fatores crescimento que impulsiona o aporte vascular para o reparo (ZUBAIR; AHMAD, 2019).

Dentre os fatores de crescimento destacam-se o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) 1 e 2, fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2), os fatores de crescimento transformador beta (TGFB) 1, 2 e 3, e os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) A, B e C (FERREIRA *et al.*, 2023).

Os variados tipos de colágenos também ajudam a garantir a integridade estrutural da matriz extracelular, além de serem importantes também no processo de cicatrização e regeneração, como os colágenos tipo , I, II, III, VII, X, XI, XII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, alfa 1 (COL1A1, COL2A1, COL3A1, COL7A1, COL10A1, COL11A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL17A1, COL18A1, COL19A1), colágeno tipo I e XIX, alfa 2 (COL1A2, COL9A2), colágeno tipo IV, alfa 3 (COL4A3), colágeno tipo IV, alfa 4 (COL4A4), colágeno tipo IV, alfa 5 (COL4A5). Destacam-se os colágenos do tipo um, dois e três, pois são os mais abundantes do organismo, desses, os colágenos do tipo um estão presentes na pele, tendão e osso, inclusive nos ossos da face, além de ser o principal produto de secreção do osteoblasto, o tipo dois presente em cartilagem e humor vítreo e tipo três em pele e músculos (SORUSHANOVA *et al.*, 2023).

Os fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão gênica, aumentando ou diminuindo a transcrição de genes específicos. A transcrição é o processo de cópia da sequência de DNA de um gene para uma molécula de RNA. A expressão gênica é o processo de uso da informação contida no RNA para produzir proteínas (MA e MENG; 2019).

Os fatores de transcrição auxiliam e apontam quais genes estão ativos em cada célula do seu corpo, influem em quando, onde e como os genes serão transcritos, tornando-se essencial para o controle da expressão gênica. Relacionados a esse

processo temos genes como as proteínas Homeobox MSX-1 e 2 (MSX1 e MSX2), fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX2), membros da família SMAD 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD6, SMAD7, SMAD8, SMAD9), fator de transcrição SOX-9 (SOX9) e a proteína 1 relacionada à torção (TWIST1) (MA e MENG, 2019).

As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, reguladas pelo controle da expressão gênica. Atuam na regulação da transcrição, ativação de pró-enzimas e também podem ser reguladas por inibição direta (inibidores teciduais de metaloproteinases). Entre elas destacam-se a MMP2 e a MMP13 por seu papel no reparo tecidual e no desenvolvimento ósseo (SIMÕES *et al.*, 2019).

Da mesma forma, outros genes são essenciais no processo de formação óssea, a ameloblastina (AMBN), osteocalcina (BGLAP), sialoproteína óssea (IBSP), endopeptidase neutra reguladora de fosfato (PHEX), fosfoproteína 1 secretada (SPP1), tuftelina (TUFT1) e a proteína 11 que interage com a tuftelina (TFIP11), todas estão envolvidas na biomineralização, que baseia-se no acúmulo de mineral, basicamente composto por íons de fosfato e cálcio, formando sal de fosfato de cálcio, estrutura essa que se transforma em hidroxiapatita, mineral encontrado dentro do tecido (CRUZ *et al.*, 2022).

Arilsulfatase (ARSE) ajuda no desenvolvimento esquelético, caderina 11 (CDH11) auxilia na adesão celular, o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (CSF2) é uma citocina que atua como fator de crescimento, a proteína Matrix Gla (MGP) age na osteogênese, esclerostina (SOST) influencia no crescimento ósseo, a proteína secretada ácida é rica em cisteína (SPARC) e auxilia no crescimento celular. Todos esses genes estão envolvidos no processo de osteogênese, processo de formação óssea por osteoblastos.

### **3.3 Engenharia tecidual**

No início dos anos 80, foram realizados os primeiros procedimentos bem-sucedidos com um substituto de tecido cutâneo. Nesse período, foi descrito uma técnica para cultivar e proliferar a epiderme a partir de um fragmento coletado por uma biópsia de pele humana. Os queratinócitos isolados da biópsia proliferaram através da co-cultura com uma camada de células mesenquimais de camundongo, expandindo

seu número de células em milhares de vezes em semanas. Essa inovação tecnológica levou ao primeiro produto de engenharia de tecidos baseado em células (BERTHIAUMA *et al.*, 2011).

A engenharia tecidual é uma ciência interdisciplinar, que combina e aplica o conhecimento da bioengenharia, biologia, transplante de células e ciência dos materiais a fim de desenvolver estratégias terapêuticas e substitutos que restauram, mantêm, substituem ou melhoram as funções biológicas dos tecidos perdidos, produzindo novos biomateriais que agirão mutuamente com os sistemas biológicos (NETO e FERREIRA; 2018).

A engenharia tecidual procura produzir formações semelhantes aos tecidos, com a finalidade de reparar ou substituir a função de um órgão defeituoso. Diante disso, a regeneração de tecidos é um processo complexo que requer a participação de três componentes fundamentais: a célula, a estrutura de suporte e as moléculas de sinalização (HAUGEN; LYNGSTADAAS, 2019).

As células são as unidades básicas do tecido e são responsáveis pela formação do novo tecido, são empregadas células vivas, principalmente células-tronco (são células indiferenciadas que podem se dividir em duas células-filhas, a divisão pode ser simétrica, resultando em duas células-filhas idênticas à célula-tronco original, ou assimétrica, resultando em uma célula-filha diferenciada e outra célula-tronco) que se diferenciam em diferentes linhagens celulares (HAUGEN; LYNGSTADAAS, 2019).

Os materiais biocompatíveis formam uma estrutura de suporte que funciona como um arcabouço, fornecendo um ambiente adequado para o crescimento e a proliferação das células. Essas estruturas também apoiam, transportam células e sinais bioativos (HAUGEN; LYNGSTADAAS, 2019). As moléculas de sinalização (sinais bioativos) que são substâncias que regulam a atividade das células e coordenam o processo de regeneração, induzem diferenciação e formação de tecido (fatores bioquímicos, como fatores de crescimento e fatores físicos, como as cargas mecânicas cíclicas). Quando se realiza a transposição desses três elementos para o contexto *in vitro*, a matriz extracelular é substituída por uma estrutura de suporte que pode ser de natureza sintética ou de origem natural que são empregadas dispondo e organizando as células tridimensionalmente (HAUGEN; LYNGSTADAAS, 2019).

A regeneração tecidual é caracterizada por restauração da estrutura e da função do tecido original em termos de estrutura e função. O sucesso da regeneração tecidual depende de vários fatores, incluindo a natureza e a qualidade das células

envolvidas no processo. As células-tronco devem ser capazes de se diferenciarem em células do tecido original. Os fatores de crescimento e moléculas de sinalização devem ser capazes de ativar as células-tronco e coordenar o processo de regeneração. E o microambiente deve fornecer nutrientes e oxigênio necessários para o crescimento e a proliferação das células (URBAN e MONJE; 2019).

Nesse sentido, um desafio na medicina regenerativa é encontrar um material que possa substituir um tecido danificado com a mesma função e durabilidade do tecido original. As células-tronco são promissoras para esse desafio, pois podem se diferenciar em qualquer tipo de célula. A pesquisa com células-tronco tem recebido considerável atenção no campo médico, bem como, na odontologia, sendo prontamente cultivadas e induzidas a se diferenciarem em qualquer tipo de célula em um meio de cultura específico. Um nicho de células-tronco é o ambiente extracelular que fornece as condições necessárias para a sobrevivência e a proliferação das células-tronco. As células-tronco recebem influências de outros tipos de células dentro do nicho, que ajudam a controlar sua diferenciação. Dessa forma, as células tronco podem estar ligadas a arcabouços ou sementeadas em um material composto e poroso. Normalmente, são utilizados três principais tipos de células-tronco na bioengenharia: as células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco pluripotentes induzidas (CTPI) (BAPTISTA *et al.*, 2018).

Em relação às CTM, uma das características é seu potencial na diferenciação em osteoblastos, adipócitos ou condroblastos *in vitro*, porém, elas também possuem a capacidade de se transformar em outros tipos de células mesenquimais e não mesenquimais, como: miócitos, tendinócitos, células ligamentares, células musculares lisas, células endoteliais, cardiomiócitos, hepatócitos e células neurais.

Já as CTPI, são linhagens de células-tronco específicas do indivíduo que podem ser criadas a partir de células maduras, como células mononucleares do sangue periférico, por punção venosa ou por biópsia de pele usando células fibroblásticas da derme. Essa técnica permite a criação de células-tronco que podem ser usadas em bioimpressoras e estudadas em laboratório, auxiliando dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos de variabilidade fenotípica das células, minimizando a rejeição das mesmas quando transplantadas de volta ao hospedeiro para fins de se obter a regeneração tecidual. Dessas, a utilização das CTE tem sido regularmente questionada devido aos problemas éticos e legais (ONG *et al.*, 2018).

### 3.4 Biomateriais

Biomateriais são materiais, naturais ou sintéticos, que interagem com sistemas biológicos e atuam como matéria prima, conhecidas como arcabouços ou “scaffolds”. A ciência dos biomateriais é uma área interdisciplinar que combina conhecimentos de medicina, biologia, física, química e engenharia de tecidos. Podem ser feitos de uma variedade de materiais, incluindo metais, cerâmicas, plásticos e até mesmo vidro. Geralmente, são biodegradáveis e alguns são bioabsorvíveis, isso significa que eles podem ser degradados ou absorvidos pelo corpo ao longo do tempo. Existem materiais que apresentam propriedades favoráveis ou desfavoráveis à fabricação de arcabouços por impressão em 3D, logo, é necessário que os biomateriais sejam adequados para a bioimpressão (BAPTISTA *et al.*, 2018). A busca por um biomaterial ideal tem sido frequente. Alguns tipos de biomateriais como as biocerâmicas, por exemplo, o beta tri cálcio fosfato, hidroxiapatita (HA) e fosfatos bi cálcicos são usadas em tratamentos cirúrgicos com a intenção de substituir materiais metálicos. São biocompatíveis, possuem resistência a corrosão e já demonstram ter bioatividade *in vivo*, contudo apresentam algumas desvantagens, como a baixa resistência e fragilidade (BAPTISTA *et al.*, 2018).

Assim como as biocerâmicas, que podem ser sintéticas ou naturais, os polímeros são um outro tipo de biomaterial usado na fabricação de arcabouços, geralmente, são de fácil fabricação e baixo custo, tornando-os uma escolha popular na formação dos biomateriais, são usados em uma variedade de aplicações médicas, incluindo materiais odontológicos e cirurgias. Os materiais biocompatíveis mais usados são o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGLA), policaprolactona (PCL) e misturas de polietilenoglicol (PEG). Para as impressoras 3D, os mais empregados são o PLA e o o acrilonitrila-butadienoestireno (ABS). Embora o ABS não seja biodegradável e geralmente não biocompatível, há exceção dos plásticos ABS M30i, que são adequados para aplicações em biotecnologia (ZHOU *et al.*, 2020).

A organização internacional de padronização, conceitua biocompatibilidade como a capacidade de um material de funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica. Nesse sentido, o ABS M30i possui certificação ISO 10993, sendo um material de alta resistência e biocompatível, adequado para as indústrias médica, farmacêutica e de embalagens de alimentos (MERAZZO *et al.*, 2023).



O PLA se constitui em um polímero termoplástico, semicristalino ou amorfo. É sintetizado a partir do amido, obtido de fontes biológicas, como milho, beterraba, cana de açúcar, trigo e batata, através da bioconversão e polimerização. O PLA apresenta propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, não imunogenicidade, não inflamatório para o corpo humano, sendo amplamente explorado para aplicações na engenharia de tecidos (ALAM *et al.*, 2020).

O PC-ISO (policarbonato-ISO) é um polímero termoplástico de engenharia industrial, biocompatível, não tóxico, não apresenta potencial alergênico e não apresenta efeitos irritantes. O PC-ISO normalmente é utilizado em embalagens de alimentos, medicamentos e na fabricação de dispositivos médicos, devido à sua resistência mecânica e à sua biocompatibilidade. O PC-ISO tem sido um material de escolha para muitas aplicações médicas, facilitando a viabilidade técnica para uso como arcabouços lombares, que proporcionam resistência e integração adequada ao osso (GÓMEZ-GRAS *et al.*, 2021).

É importante destacar que o “scaffold” ou arcabouço é usado para um biomaterial tridimensional, que tem a capacidade de fornecer um ambiente adequado, proporcionando sinais regenerativos às células, simulando um comportamento natural. Dessa forma, o arcabouço desempenha um papel único na regeneração e reparo dos tecidos. São materiais sólidos, porosos, projetados para promover interações célula-biomateriais, adesão celular e deposição da MEC e permitir transporte suficiente de gases, nutrientes e fatores reguladores para garantir a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (CHOCHOLATA *et al.*, 2019).

Essas atribuições são devidas à estrutura do arcabouço, onde os poros interconectados e a alta porosidade permitem a ligação celular, o que facilita a regeneração em 3D do tecido, crescimento celular, proliferação, diferenciação, difusão de resíduos e produtos de degradação, bem como ao tamanho dos poros, que devem ser grandes o suficiente para permitir a migração das células, ao mesmo tempo, pequenos para permitir a adesão das células ao arcabouço. Após a implantação do arcabouço, as ações terapêuticas devem ser harmonizadas com os eventos biológicos para facilitar um melhor processo de cicatrização (PASSOS *et al.*, 2022).

### **3.5 Bioimpressoras e tecnologia de impressão 3-D**

A cultura celular bidimensional (2D) é comumente usada por laboratórios desde

a descoberta da célula como unidade básica do tecido. Contudo, por não imitar o microambiente de tecido nativo a cultura em 2D não replica a morfologia. Assim, gradientes de nutrientes, oxigênio e outros fatores encontrados no tecido nativo são praticamente inexistentes no modelo 2D, suprimindo muitos estímulos que orientam o comportamento celular (BAPTISTA *et al.*, 2018).

Nesse contexto, é apresentado a biofabricação, que é um processo que age promovendo componentes celulares e não celulares no espaço, para simular a funcionalidade e a constituição do tecido humano. A bioimpressão é uma tecnologia de biofabricação 3D que destina biomateriais carregados de células para construir tecidos vivos, complexos e funcionais. É uma técnica promissora para o transporte de células (SANTOS-BEATO *et al.*, 2022).

A impressão tridimensional (3D) possui o potencial de direcionar a impressão de arcabouços porosos com desenho projetado, química controlada e porosidade interconectada, possibilitando um controle preciso das partes internas e externas da estrutura. Apesar de relativamente recente, um rápido desenvolvimento tecnológico fez com que sua utilização se expandisse com grande velocidade (ZHOU *et al.*, 2020).

Esse desenvolvimento propiciou uma diminuição nos custos das impressoras 3D, proporcionando a sua aplicação em bibliotecas, escolas, residências e laboratórios, e possibilitando a impressão em pequenas quantidades de produtos personalizados com custos relativamente baixos. Tal cenário se tornou bastante proveitoso no campo biomédico, onde geralmente são necessários produtos individualizados para o paciente (NGO *et al.*, 2018).

A tecnologia FDM (do inglês “fused deposition modelling”) opera com as impressoras em 3D, possui baixo custo e variedade de materiais que podem ser usados nas propriedades mecânicas efetivas das peças. Além disso, possuem peças fortes em qualquer processo de fabricação de aditivos à base de polímeros, alta velocidade de impressão e simplicidade no processo. Utiliza um filamento contínuo de polímero termoplástico para imprimir camadas de materiais em 3D. A termoplasticidade do filamento de polímero é uma propriedade essencial para esse método, pois permite que os filamentos se fundam durante a impressão e depois se solidifiquem à temperatura ambiente após a impressão (NGO *et al.*, 2018).

#### **4 MANUSCRITO 01**

### **EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEOLASTOS CULTIVADOS EM ARCABOUÇOS DE POLICARBONATO DE ÁCIDO POLILÁTICO (PLA)**

#### **Resumo**

Lesões orofaciais podem estar relacionadas à perda da continuidade óssea e, conseqüentemente, a danos estruturais e funcionais que prejudicam a qualidade de

vida. A produção de tecidos biológicos a partir de culturas celulares é sugerida como estratégia auxiliar para cirurgias reconstrutivas orofaciais, porém, a eficácia da técnica depende de uma estrutura de suporte que oriente a formação de tecidos funcionais de acordo com o leito receptor. Nesse contexto, foi investigada a assinatura de expressão gênica e a funcionalidade de células osteoblásticas SAOS-2 cultivadas em matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional. Para isso, os osteoblastos cultivados em arcabouços de policarbonato de ácido polilático (PLA), foram avaliados pelo sistema Array Real Time PCR (RT-qPCR) para determinar a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, mineralização óssea, ossificação, fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na inflamação e cicatrização. Foi observado no mapa de calor um aumento na expressão de alguns genes, relacionados a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas, assim como, a expressão dos genes relacionados à produção de colágeno, fatores de crescimento, receptores, fatores de transcrição e alguns outros genes que não pertencem a essas classes, destacando-se os genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *spp1*, *minpp1*, *ibsp*, *fgf2*, *tgfb2*, *smad1*, *smad5*, *smad4*, *bmpr1* e *fgr1*. Os resultados obtidos demonstram que os arcabouços de PLA, permitem a expressão de grande parte dos genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*. Assim, a utilização desse biomaterial na engenharia tecidual mostra-se promissora.

**Palavras-chave:** osteoblastos, *scaffolds*, expressão gênica, engenharia tecidual.

#### 4.1 Introdução

As perdas de tecido ósseo ou lesões orofaciais impactam no bem-estar e na saúde do ser humano. A depender da dimensão da lesão, das condições locais, sistêmicas e da própria natureza da lesão, a capacidade regenerativa do tecido ósseo pode ser afetada. Dessa forma, intervenções terapêuticas com o propósito de restaurar o tecido lesado são necessárias (MINUTTI *et al.*, 2019).

O transplante de tecidos tem sido usado como alternativa para recuperar a estrutura óssea perdida, principalmente, os procedimentos que envolvem enxertos ósseos (BAPTISTA *et al.*, 2018). Contudo, existem limitações relacionadas ao uso dos enxertos, como a quantidade e qualidade limitada de osso, o risco de transmissão de doenças, reações imunes e a possibilidade de regeneração incompleta do tecido (CHAVDA e LEVIN, 2018). A reconstrução dos defeitos maxilofaciais se mostra desafiadora e de difícil reprodução, impulsionando o desenvolvimento da engenharia tecidual com a produção de novos biomateriais (SOFIA-NETO; FERREIRA, 2018).

Para regenerar os tecidos perdidos com morbidade reduzida é necessário que os biomateriais sintéticos se comuniquem com os sistemas biológicos, devendo apresentar facilidade para sua disponibilização e esterilização. Há utilização de células, fatores de crescimento e arcabouços, que servem como suporte estrutural

para a adesão, proliferação e diferenciação celular, influenciando os processos naturais de regeneração e desenvolvimento de tecidos, atuando como uma matriz extracelular temporária (SOFIA-NETO; FERREIRA, 2018; YU *et al.*, 2018).

Para a construção de arcabouços 3D são utilizados polímeros que podem ser de ocorrência natural, polímeros sintéticos biodegradáveis e polímeros sintéticos não biodegradáveis (SOFIA-NETO; FERREIRA, 2018; YU *et al.*, 2018). Nesse sentido, o ácido poliláctico (PLA), polímero de origem natural, tem mostrado seu valor por ser biocompatível, biodegradável e atóxico, tornando-se um aliado na engenharia tecidual (LAUER *et al.*, 2020).

Para que possam ser empregados como biomateriais para regeneração óssea, esses polímeros devem permitir a adesão celular e diferenciação osteoblástica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos cultivados sobre arcabouços de PLA.

## 4.2 Material e métodos

Este estudo experimental *in vitro* foi realizado com uma linhagem celular disponível comercialmente e, portanto, não necessitou de aprovação de comitê de ética em pesquisa.

As matrizes rígidas foram obtidas por impressão em 3D, utilizando placas de PLA, as placas de PLA foram fabricadas na impressora 3D industrial Stratasys Fortus 380 mc, por meio da técnica de manufatura aditiva modelagem por deposição de material fundido (Fused Deposition Modeling - FDM).

Os arcabouços foram fabricados com espessura de 2 mm, diâmetro externo de 13 mm, cavidades com 0,35 mm de diâmetro e espaçamento entre as cavidades de 1 mm de centro a centro. O modelo, em forma de disco, possui microporos de 0,35 mm produzidos por uma furadeira automática, com uma base sólida.

As células osteoblásticas humanas SAOS-2 (HTB-85<sup>TM</sup>), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram plaqueadas nos arcabouços contidos em placas de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/arcabouço, e cultivadas em 1 mL de meio McCoy's 5A (Sigma, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Gibco, Life Technologies, EUA), 100 IU/mL de penicilina (Sigma,

St. Louis, MO, EUA) e 50 µg/mL estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Essa mesma quantidade de células e meio foi cultivada em um poço de poliestireno, como controle da cultura. Todo o experimento foi feito em triplicata.

#### 4.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR

As reações de PCR quantitativo utilizando a transcriptase reversa foram feitas utilizando-se o sistema QuantStudio™ Design & Analysis Software, no aparelho QuantStudio. Os genes avaliados estão descritos no material suplementar (APÊNDICE A). O grupo de poliestireno foi usado como referência.

Após o período de 5 e 10 dias de cultivo celular, foi realizada a extração do RNA total com o kit Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (230, 260, 280 e 320 nm).

Posteriormente, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 4 µg de RNA total. Esse procedimento foi feito no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.2.2 Análise estatística

Foi construído um mapa de calor, a fim de fornecer uma representação gráfica do perfil de expressão gênica das moléculas estudadas, onde os genes mais expressos estão na escala próxima ao número 10, representado pela cor vermelha e menos expressos estão na escala próxima ao número 0, representado pela cor verde (Figura 1). Os valores obtidos a partir das células cultivadas com poliestireno foram utilizados como referência.

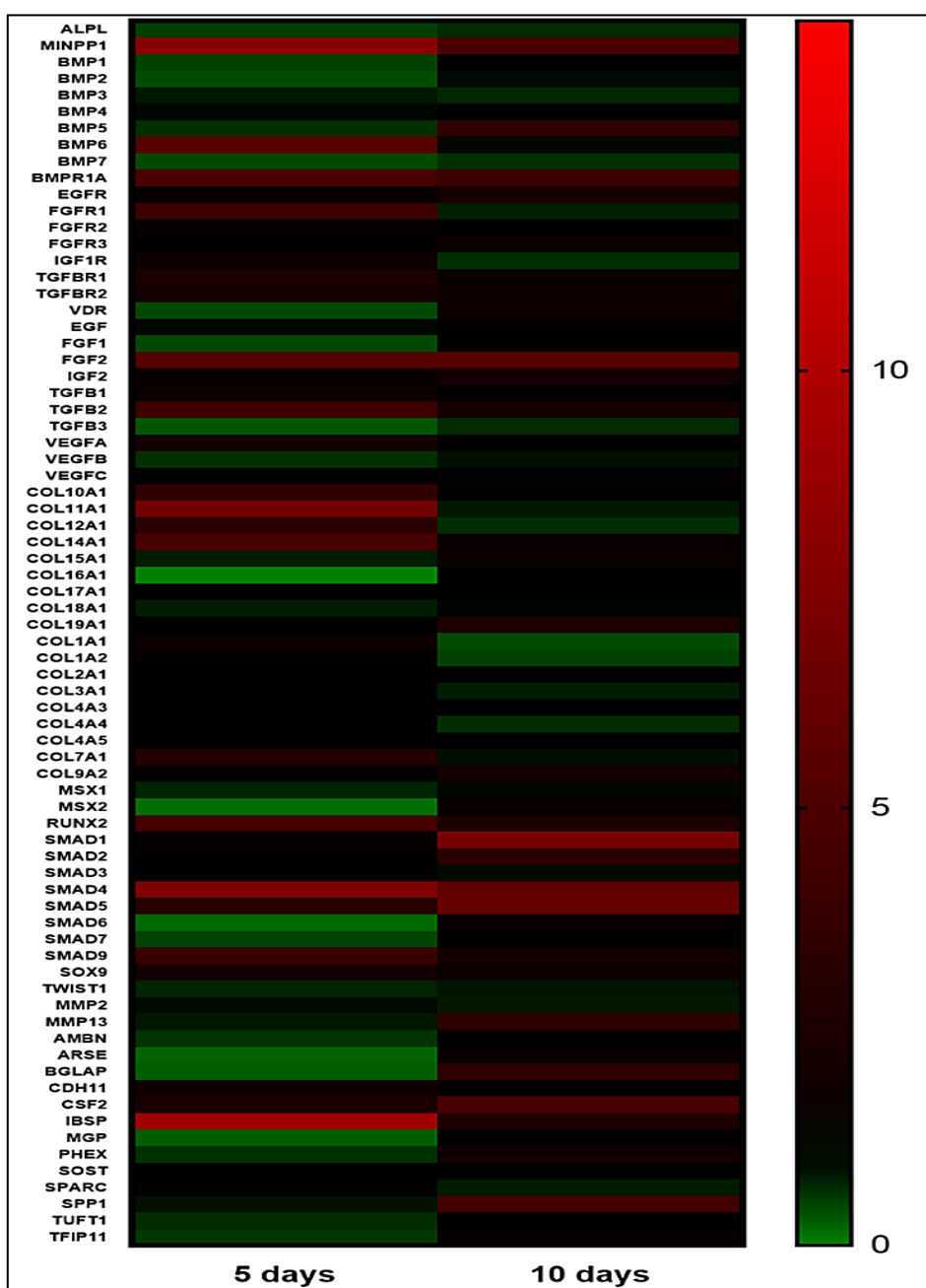
Os valores de C<sub>q</sub>, Delta C<sub>q</sub> e fold change foram extraídos para cada gene e as análises foram realizadas pelo método de quantificação relativa pelo cálculo de  $\Delta\Delta C_q$ , sendo o GAPDH utilizado como gene de referência. Além disso, foram comparados os níveis de expressão do fold-change ( $2^{\Delta\Delta C_q}$ ) entre os grupos referência e

experimental.

### 4.3 Resultados

Pela análise do mapa de calor é possível observar um aumento na expressão dos genes BMP6 (5 dias) e BMP5 (10 dias), relacionados a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas.

**Figura 1.** Mapa de calor demonstrando a expressão gênica dos osteoblastos cultivados nos arcabouços de PLA após 5 (eixo Y) e 10 dias (eixo X).



Fonte: os autores.

A expressão dos genes relacionados à produção de colágeno foi aumentada com cinco dias de cultivo, destacando-se o COL11A1, no entanto, houve uma redução nessa produção com dez dias. Já para os fatores de crescimento, houve uma maior expressão dos genes FGF2 e TGFB2 com cinco dias de cultivo. Contudo, a expressão do gene FGF2 se manteve elevada ao longo dos 10 dias de cultivo. Os demais genes investigados tiveram baixa expressão.

O arcabouço de PLA induziu aumento na expressão dos genes associados ao grupo de receptores FGFR01 e BMPR1A nos dois tempos de cultivo. No que diz respeito aos genes de fatores de transcrição, percebe-se que o mais expresso no cultivo de cinco dias foi o SMAD4. Observa-se, ainda, que os genes RUNX2, SMAD5, SMAD9 e SOX9 também foram expressos. Aos dez dias de cultivo, alguns genes também foram mais expressos, como o RUNX2, SMAD1, SMAD2, SMAD4 e SMAD5.

Com relação aos genes diversos, como aqueles que codificam as fosfatases e as metaloproteinases por exemplo, os de maior expressão com cinco dias de cultivo foram o IBSP e MINPP1. No cultivo de 10 dias, os genes MINPP1, MMP13, BGLAP, CSF2, IBSP, PHEX e SPP1 tiveram sua expressão aumentada.

#### **4.4 Discussão**

No presente estudo, o biomaterial PLA apresentou células com regulação positiva na maioria dos genes estudados após cinco dias de cultivo. Estes dados complementam os achados de Santos (2020) e Araújo (2020), que observaram baixa citotoxicidade e biocompatibilidade nos arcabouços de PLA. De maneira geral, observou-se uma tendência superficial de queda na expressão gênica com dez dias após o início da cultura celular.

O gene das proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) mais expresso nas células cultivadas por cinco dias foi o da BMP6 e o mais expresso nas células cultivadas por dez dias foi o da BMP5. Essas proteínas regulam o desenvolvimento de ossos e cartilagens. As BMP são eficientes em iniciar a neoformação óssea, facilitando os processos de reparo (ALRAEI *et al.*, 2020). Os ligantes dessa família se ligam a vários receptores de TGF-beta, levando ao recrutamento e ativação de fatores de transcrição da família SMAD, que atuam na regulação da expressão gênica de fatores relacionados ao metabolismo ósseo. SMAD4, por exemplo, cuja expressão foi elevada



nas células com cinco dias de cultivo, tem um papel significativo na regulação da viabilidade de osteoblastos e osteócitos, controlando a homeostasia óssea (ZHAO *et al.*, 2018).

Dos genes relacionados às proteínas da família dos colágenos, cruciais nos processos de cicatrização, destaca-se o gene *col9a2* que manteve regulação positiva aos dez dias. A deleção do gene *col9a2*, cuja proteína é um componente do colágeno primordial da cartilagem hialina, induz e acelera a progressão da degeneração óssea (XU *et al.*, 2022).

Além dos colágenos para o reparo tecidual, seja ele por regeneração ou por cicatrização, os fatores de crescimento são fundamentais para estabelecer a comunicação entre as células e a ativação de fatores de transcrição intracelulares. O gene *fgf2* que codifica para o fator de crescimento FGF2 teve expressão aumentada nos dois tempos de cultivo. Esse gene exerce papel importante na regulação da sobrevivência, divisão, diferenciação e migração celular, promovendo a diferenciação de odontoblastos (VIDOVIC-ZDRILIC *et al.*, 2018). A proteína FGF2 atua como um ligante para TGF $\beta$ 2 e para o receptor FGFR1, que também apresentaram regulação positiva aos cinco dias de cultivo.

Já no grupo dos receptores, o gene *bmpr1a* foi o mais expresso. O *bmpr1a* é o principal receptor de BMP tipo I, que transduz a sinalização BMP-SMAD durante o desenvolvimento do osso da calvária (MARUYAMA *et al.*, 2021). É relevante destacar a regulação positiva de *fgfr1*, visto que a proteína FGFR1 desempenha a função de receptor de superfície celular para os fatores de crescimento de fibroblastos e *tgfb1*, também expresso aos cinco dias de cultivo.

Ademais os genes de fatores de transcrição, além do aumento na expressão do *smad4*, gene que além da homeostase óssea atua no equilíbrio entre atrofia e hipertrofia nas células (PAKRAVAN *et al.*, 2022), destacaram-se os genes *runx2*, *smad5*, *smad9* e *sox9*, primordiais para a diferenciação osteoblástica, morfogênese esquelética e na diferenciação dos condrócitos. O gene *runx2*, além de estar envolvido na proliferação de progenitores de osteoblastos, induz a sua proliferação parcialmente pela regulação da expressão de *fgfr2* e *fgfr3* (KAWANE *et al.*, 2018), genes que não foram expressos no presente experimento. Outros mecanismos de proliferação induzida por *runx2* precisam ser melhor elucidados.

Outros genes tiveram a sua expressão aumentada como: o da *ibsp*, proteína não colagena, que modula a atividade das células ósseas e controla a mineralização;

o da MINPP1, que atua no processo de ossificação endocondral; o da CDH11, essencial no desenvolvimento e manutenção do osso e na sinalização intracelular (MANOHAR *et al.*, 2020); e o da CSF2, citocina que controla a produção, diferenciação e função de granulócitos e macrófagos.

Alguns genes importantes na codificação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo, as fosfatases e as metaloproteinases, tiveram baixa expressão nas células cultivadas por cinco dias (*alpl*, *ibsp*, *mmp13*, *ambn*, *bglap*, *mgp*, *phex*, *spp1*, *tuft1* e *tfp11*), enquanto outros (*minpp1*, *mmp13*, *ibsp*, *bglap*, *csf2*, *phex* e *spp1*) tiveram sua expressão aumentada com o mesmo arcabouço de PLA após dez dias, indicando que a expressão gênica nas células cultivadas com PLA pode ser um pouco mais tardia.

É necessário interpretar os dados obtidos com parcimônia, tendo em vista que se trata de um estudo *in vitro* realizado com linhagem de osteoblastos. Estes achados permitirão um delineamento mais objetivo de estudos em animais com o emprego de arcabouços de sacrifício para demonstrar se essa regulação irá se confirmar na produção da matriz óssea.

#### 4.5 Conclusão

O arcabouço de PLA permite a expressão de grande parte dos genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*. Assim, a utilização desse biomaterial na engenharia mostra-se promissora, direcionando caminhos para novos estudos agora *in vivo*.

#### Referências

ARAÚJO, M. C. **Análise da viabilidade celular e mineralização da matriz extracelular de culturas osteoblásticas crescidas sobre matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional.** 2020. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic, São Paulo, 2020.

ALRAEI, K.; SHARQAWI, J.; HARCHER, S.; GHITA, I. Efficacy of the Combination of rhBMP-2 with Bone Marrow Aspirate concentrate in Mandibular Defect reconstruction after a Pindborg Tumor Resection. **Case Report in dentistry**, V. 2020. 2020

BAPTISTA, L. S.; KRONEMBERGER, G. S.; CÔRTEZ, I.; CHARELLI, L. E; MATSUI, R. A. M., PALHARES; T. N.; *et al.* Adult stem cells spheroids to optimize cell

colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, p.1-14, 2018.

CHAVDA, S., LEVIN, L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: a systematic review. **Journal of Oral Implantology**, v.44, n. 1, 2018.

CHIEEN, K. H., CHANG, Y. L., WANG, M. L., CHUANG, JEN-HUA; YANG, YA-CHI; TAI, MING-CHENG; WANG, C.Y; LIU, YUNG-YANG; LI, HSIN-YANG; CHEN, JIANG-TORNG; KAO, SHOU-YEN; CHEN, HEN-LI; LO, WEN-LIANG . Promoting induced pluripotent stem cell-driven biomineralization and periodontal regeneration in rats with maxillary-molar defects using injectable BMP-6 hydrogel. **Scientific Reports**, v. 8, n. 114, 2018.

KAWANE, T., QIN, X., JIANG, Q., MIYAZAKI, T., KOMORI, H., YOSHIDA, C.A., MATSUURA-KAWATA, V.K.D.S., SAKANE, C., MATSUO, Y., NAGAI, K., MAENO, T., DATE, Y. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep*. 8: 13551. **Journal List Scientific Reports**. 2018.

LAUER, A.; WOLF, P.; MEHLER, D.; GÖTZ, H.; RÜZGAR, M.; BARANOWSKI, A.; HENRICH, D.; ROMMENS, P. M.; RITZ, U. Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences Article**, v. 21. n.6. 2020.

MANOHAR, S.; CAMACHO-MAGALLANES.; ECHEVERRIA, JR. C.; CRYSTAL, D.R. Cadherin-11 Is Required for Neural Crest Specification and Survival. **Frontiers in Physiology**. v.11. 2020.

MARUYAMA, T.; STEVENS, R.; BOKA, A.; DIRIENZO, L.; CHANG, C.; YU, H.I.; NISHIMORI, K.; MORRISON, C.; HSU, W. BMP1A maintains skeletal stem cell properties in craniofacial development and craniosynostosis. **Sci Transl Med**. V. 3, n 13. P. 4416. 2021.

MINUTTI, C.M.; MODAK, R.V.; MACDONALD, F.; LI, F.; SMYTH, D.J.; DORWARD, D.A.; BLAIR, N.; HUSOVSKY, C.; MUIR, A.; GIAMPAZOLIAS, E.; DOBIE, R.; MAIZELS, R.M.; KENDALL, T.J.; GRIGGS, D.W.; KOPF, M.; HENDERSON, N.C.; ZAISS, D.M. A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. **Immunity**, v.19, n. 3, p. 645-654. 2019.

SOFIA-NETO, A.S., FERREIRA, J.M.F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**. 2018.

PAKRAVAN, K.; RAZMARA, E.; MAHMUD HUSSEN, B.; SATTARIKIA, F.; SADEGHIZADEH, M.; BABASHAH, S. SMAD4 contributes to chondrocyte and osteocyte development. **J Cell Mol Med**. V.26. n.1. p 1-15. 2022.

SANTOS, M. C. G. **Avaliação da proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina em células osteoblásticas crescidas sobre matrizes rígidas produzidas**

**com impressora tridimensional.** 2020. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Centro de Pós-Graduação São Leopoldo Mandic, São Paulo. 2020.

VIDOVIC-ZDRILIC, I.; VINING, K.H.; VIJAYKUMAR, A.; KALAJZIC, I.; MOONEY, D.J.; MINA, M. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by  $\alpha$ SMA+ Progenitors In Vivo. *Journal List. J Dent Res.* 97(10): 1170–1177. 2018.

XU, H., DONG, R., ZENG, Q., FANG, L., GE, Q., XIA, C., ZANG, P., NV, S., ZOU, Z., WANG, P., LI, J., RUAN, H., HU, S., WU, C., JIN, H., TONG, P. Col9a2 gene deletion accelerates the degeneration of intervertebral discs. **Experimental and Therapeutic Medicine.** Volume 23 Issue 3. 2022.

YU, J., XIA, H., NI, Q. A Three-Dimensional Porous Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering, **Journal of Materials Science**, 53 (7): 4734–44. 2018.

ZHAO, M.; MISHRA, L.; DENG, C. X. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. **Int J Biol Sci**, v.14, n. 2, p 111-123. 2018.

## 5 MANUSCRITO 02

### EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS EM PLACAS DE POLICARBONATO-ISO (PC-ISO)

#### Resumo

A conexão entre biomateriais, tecidos biológicos e engenharia tecidual é considerada uma alternativa para auxiliar cirurgias reconstrutivas orofaciais, dadas as limitações encontradas com o uso de enxertos nos casos de reconstruções complexas. Este trabalho examinou a assinatura de expressão gênica de células osteoblásticas SAOS-2 cultivadas em matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional. Para isso, os osteoblastos foram cultivados em arcabouços de Policarbonato-ISO (PC-ISO) e a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, mineralização óssea, ossificação, fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na inflamação e cicatrização foi avaliada pelo sistema Array Real time PCR (RT-qPCR). Houve um aumento na expressão de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, como dos genes relacionados à superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas, produção de colágeno, fatores de crescimento, receptores e fatores de transcrição, com destaque para *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad1*, *runx2*, *bmPr1a* e *Fgfr*, demonstrando o potencial do PC-ISO como biomaterial na engenharia tecidual. Portanto, os arcabouços de PC-ISO permitem a regulação positiva da expressão de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, sendo promissores para reconstrução óssea.

**Palavras-chave:** expressão gênica, osteoblastos, *scaffolds*, policarbonato-iso.

#### 5.1 Introdução

A destruição do tecido ósseo advinda de traumas ou doenças afeta profundamente a qualidade de vida do indivíduo. Transplantes com enxertos ósseos,

principalmente, enxertos autógenos, têm sido utilizados para recuperar o tecido perdido, contudo, sua quantidade e disponibilidade são limitadas (MINUTTI *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019).

Nesse sentido, a engenharia tecidual vem ganhando destaque nos processos de regeneração e formação óssea, através da utilização de biomateriais associados a tecidos biológicos. Os biomateriais promovem a regeneração do defeito ósseo, agindo como uma matriz extracelular temporária para o crescimento celular, estimulando os processos de regeneração e desenvolvimento dos tecidos e funcionando como suporte estrutural para a adesão, proliferação e diferenciação celular (YU *et al.*, 2018).

O policarbonato-ISO (PC-ISO), polímero termoplástico, não tóxico e biocompatível é um material indicado para diversas finalidades médicas. A utilização desse biomaterial no processo de regeneração óssea é feita com ajuda da tecnologia de impressão em 3D, empregada por apresentar geometria precisa e favorecer um *design* fiel na reconstrução a ser feita (SOFIA-NETO; FERREIRA, 2018).

A fim de compreender a influência dos biomateriais na reconstrução do tecido ósseo, esse estudo avaliou o conjunto de expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos SAOS-2 cultivados em Policarbonato-ISO.

## 5.2 Material e métodos

Este estudo experimental *in vitro* foi realizado com uma linhagem celular disponível comercialmente e, portanto, não necessitou de aprovação de comitê de ética em pesquisa.

As matrizes rígidas foram obtidas por impressão em 3D, utilizando placas de PC-ISO, as placas de PC-ISO foram fabricadas na impressora 3D industrial Stratasys Fortus 380 mc, por meio da técnica de manufatura aditiva modelagem por deposição de material fundido (Fused Deposition Modeling - FDM).

Arcabouços com 2 mm de espessura, 13 mm de diâmetro externo e cavidades de 0,35 mm de diâmetro foram produzidos. Os microporos, de 0,35 mm, foram feitos em um modelo em forma de disco, com base sólida, por uma furadeira automática.

As células osteoblásticas humanas SAOS-2 (HTB-85<sup>TM</sup>), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram plaqueadas nos arcabouços contidos em placas de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/arcabouço, e cultivadas em 1 mL de meio McCoy's 5A (Sigma, St. Louis, MO,

EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Gibco, Life Technologies, EUA), 100 IU/mL de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 50  $\mu$ g/mL estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Essa mesma quantidade de células e meio foi cultivada em um poço de poliestireno, como controle da cultura. Todo o experimento foi feito em triplicata

### 5.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR

As reações em cadeia da polimerase quantitativas (qPCR) utilizando a transcriptase reversa foram feitas utilizando-se o sistema QuantStudio™ Design & Analysis Software, no aparelho QuantStudio. Os genes avaliados estão descritos no material suplementar (APÊNDICE A). O grupo das células cultivadas em poliestireno foi usado como referencia.

Após o período de 5 ou 10 dias de cultivo celular, foi realizada a extração do RNA total com o kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (230, 260, 280 e 320 nm).

Posteriormente, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 4  $\mu$ g de RNA total. Esse procedimento foi feito no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.2.2 Análise dos dados

Foi construído um mapa de calor, a fim de fornecer uma representação gráfica do perfil de expressão gênica das moléculas estudadas. A expressão gênica nas células cultivadas em poliestireno foi padronizada como referência para a quantificação relativa.

Os valores de C<sub>q</sub>, Delta C<sub>q</sub> e *fold change* foram extraídos para cada gene, as análises foram realizadas pelo método de quantificação relativa pelo cálculo de  $\Delta\Delta C_q$ ,

o GAPDH foi utilizado como gene de referência, além disso, comparou-se os os níveis de expressão do fold-change ( $2^{\Delta\Delta Cq}$ ) entre os grupos controle e experimental.

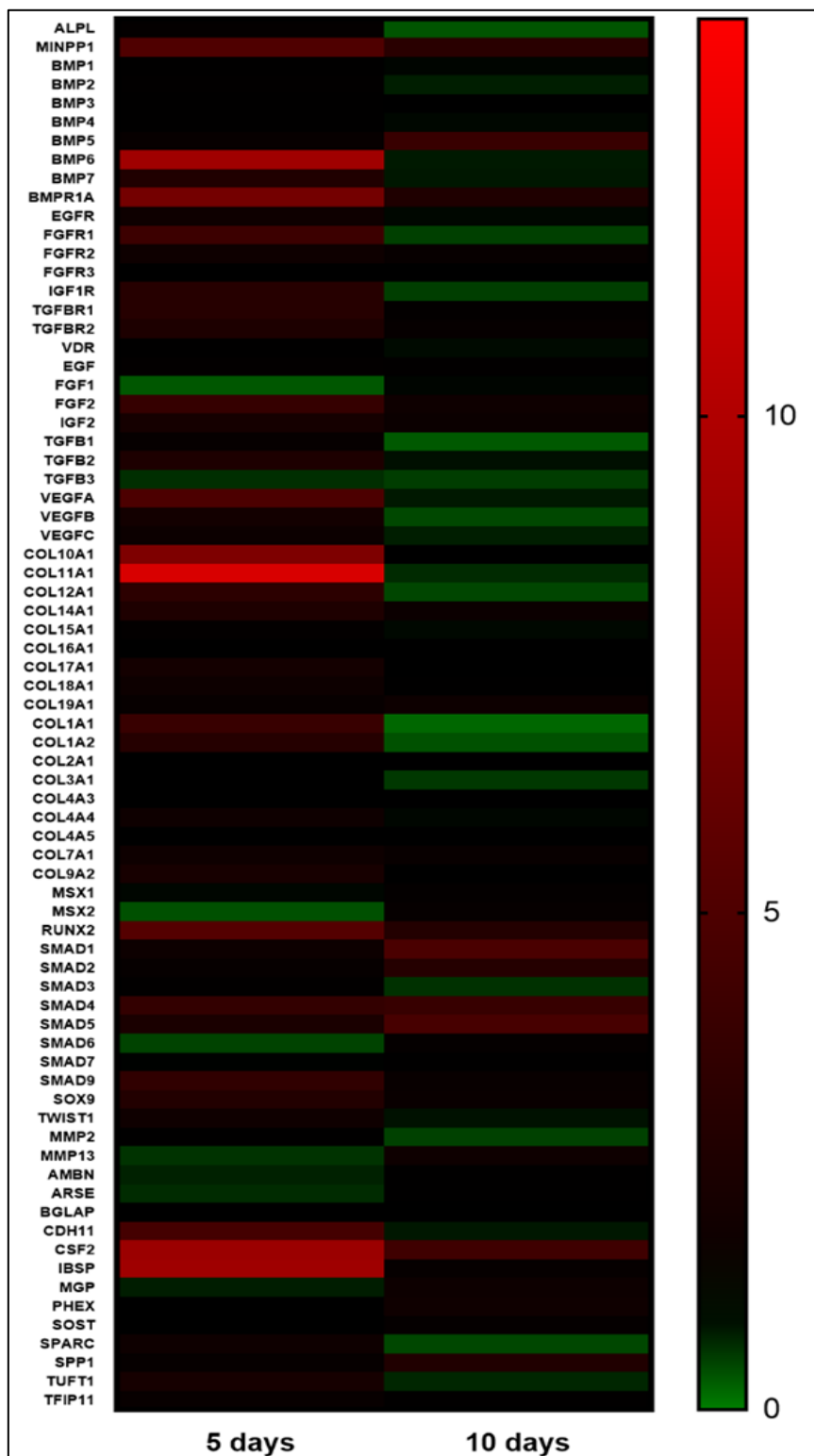
### 5.3 Resultados

Pela análise do mapa de calor, é possível observar um maior aumento na expressão dos genes relacionados a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas BMP6 (5 dias), e BMP5 (10 dias). Os genes mais expressos estão na escala próxima ao número 10, representado pela cor vermelha e menos expressos estão na escala próxima ao número 0, representado pela cor verde (Figura 1). Além de um leve aumento com cinco dias no BMP7. Com relação aos genes associados ao grupo de receptores, o *bmpr1a* foi o mais expresso, se mantendo com alta expressão nos dois tempos de cultivo analisados. Houve também um leve aumento na expressão do gene FGFR1 aos cinco dias de cultivo.

Quanto aos genes relacionados a fatores de crescimento, houve uma maior expressão do gene VEGFA com cinco dias de cultivo. A expressão dos genes relacionados a produção de colágeno foi aumentada para o gene COL11A1 nas células cultivadas por cinco dias, no entanto, houve uma redução nessa produção com dez dias.

**Figura 1.** Mapa de calor demonstrando a expressão gênica dos osteoblastos cultivados nos arcabouços de PC-ISO após 5 (eixo Y) e 10 dias (eixo X).





Fonte: os autores

O gene RUNX2 foi o mais expresso das proteínas fatores de transcrição no cultivo de cinco dias. Além dele, os genes SMAD4, SMAD5, SMAD9 e SOX9 também foram expressos. Com dez dias de cultivo, os genes SMAD1 e SMAD5 foram os mais expressos, no entanto, RUNX2, SMAD2, SMAD4 também foram expressos nos dois tempos de cultivo.

Com relação aos genes do grupo classificado como “diverso”, como aqueles que codificam as fosfatase e as metaloproteinases, por exemplo, os genes com maior expressão com cinco dias de cultivo foram CFS2 e IBSP. Houve uma leve expressão também nos genes MINPP1 e CDH11. O gene para a proteína CFS2 também se manteve com alta expressão com 10 dias de cultivo.

#### 5.4. Discussão

No presente estudo, as células cultivadas no arcabouço de PC-ISO apresentaram regulação positiva na maioria dos genes estudados, após cinco dias de cultivo. De maneira geral, observou-se uma tendência de queda na expressão gênica com dez dias após o início da cultura celular. Salienta-se que não foram encontrados estudos na literatura que tenham relacionado esse biomaterial a genes que codificam proteínas envolvidas na formação óssea, demonstrando a relevância e o caráter inovador deste estudo.

As proteínas morfogenéticas ósseas são eficientes em iniciar a neoformação óssea, facilitando os processos de reparo (ALRAEI *et al.*, 2020). O gene das proteínas morfogenéticas ósseas mais expresso nas células cultivadas por cinco dias foi o da BMP6 e o mais expresso nas células cultivadas por dez dias foi o da BMP5. Essas proteínas regulam o desenvolvimento de ossos e cartilagens. A ação da BMP6 é potencializada quando combinada com células-tronco pluripotentes induzidas (CHIEN *et al.*, 2018). A BMP5 atua como um regulador chave da homeostase basal de células-tronco (TREMBLAY *et al.*, 2020). Salienta-se que, no mesmo período de cultivo, o *bmpr1a* foi o mais expresso. A proteína BMPR1A é o principal receptor de BMP tipo I que transduz a sinalização BMP-SMAD durante o desenvolvimento do osso da calvária (PAN *et al.*, 2017).

Os ligantes da família das proteínas morfogenéticas ósseas se ligam a vários receptores de TGF-beta levando ao recrutamento e ativação de fatores de transcrição da família SMAD, que atuam na regulação da expressão gênica de fatores relacionados ao metabolismo ósseo. SMAD4, por exemplo, cujo gene manteve sua expressão com cinco e dez dias de cultivo, tem um papel significativo na regulação da viabilidade de osteoblastos e osteócitos, regulando a homeostase óssea (ZHAO *et al.*, 2018). Além da homeostase óssea, essa proteína atua no equilíbrio entre atrofia e hipertrofia nas células (MARUYAMA *et al.*, 2021). Destacaram-se ainda os genes

*runx2*, *smad5*, *smad9* e *sox9*, primordiais para a diferenciação osteoblástica, morfogênese esquelética e na diferenciação dos condrócitos. O gene *runx2*, além de estar envolvido na proliferação de progenitores de osteoblastos, induz a sua proliferação, pela regulação da expressão de *fgfr2* e *fgfr3* (KAWANE *et al.*, 2018), genes que não foram expressos no presente experimento. Outros mecanismos de proliferação induzida por *runx2* precisam ser melhor elucidados.

Também houve uma leve expressão do BMP7, gene cuja proteína atua na morfogênese esquelética e favorece a cicatrização, nas células com cinco dias de cultivo. Em relação ao processo de cicatrização, a maior expressão de *col11a1* indica um potencial aumento na fibrinogênese, função exercida pela proteína COL11A1 (XU *et al.*, 2022). Além disso, para o reparo tecidual, seja ele por regeneração ou por cicatrização, além das proteínas mencionadas, os fatores de crescimento são fundamentais, visto que estabelecem a comunicação entre as células e a ativação de fatores de transcrição intracelulares. O gene *vegfa* que funciona como fator pró-angiogênico (CAO *et al.*, 2022) foi o mais expresso no cultivo de cinco dias. O mesmo ocorreu com o gene da proteína FGFR1, que atua como receptor de superfície celular para fatores de crescimento de fibroblastos.

Outros genes também tiveram a sua expressão aumentada, como o da proteína IBSP, proteína não colagena, que modula a atividade das células ósseas e controla a mineralização, o da CSF2, citocina que controla a produção, diferenciação e função de granulócitos e macrófagos, o da MINPP1, que atua no processo de ossificação endocondral, e o da CDH11, essencial no desenvolvimento e manutenção do osso e na sinalização intracelular (MANOHAR *et al.*, 2020).

Este estudo demonstrou que a regulação dessa complexa rede de genes envolvidos no reparo ósseo é favorecida no arcabouço de PC-ISO, principalmente, nos períodos iniciais de cultura. Isso indica que o PC-ISO é um material muito promissor na reconstrução de lesões ósseas.

No entanto, visto que se trata de um estudo *in vitro* realizado com linhagem de osteoblastos, é necessário cautela na interpretação dos dados obtidos. Estes achados permitirão um delineamento mais objetivo de estudos em modelos animais com o emprego de arcabouços de sacrifício para demonstrar se essa regulação irá se confirmar na produção da matriz óssea.

## 5.5 Conclusão

Os arcabouços de PC-ISO permitem a regulação positiva da expressão de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, sendo promissores para reconstrução óssea.

## Referências

ALRAEI, K; SHARQAWI, J; HARCHER, S; GHITA, I. Efficacy of the Combination of rhBMP-2 with Bone Marrow Aspirate concentrate in Mandibular Defect reconstruction after a Pindborg Tumor Resection. **Case Report in dentistry**, V. 2020. 2020

BAPTISTA, L. S.; KRONEMBERGER, G. S.; CÔRTEZ, I.; CHARELLI, L. E; MATSUI, R. A. M., PALHARES; T. N.; *et al.* Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, p.1-14, 2018.

Cao C, Zhou Y, Zhang Y, Ma Y, Du S, Fan L, Niu R, Zhang Y, He M. GCN5 participates in KLF4-VEGFA feedback to promote endometrial angiogenesis. **iScience**. 2022.

CHAVDA, S., LEVIN, L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: a systematic review. **Journal of Oral Implantology**, v.44, n. 1, 2018.

CHIEEN, K. H., CHANG, Y. L., WANG, M. L., CHUANG, JEN-HUA; YANG, YA-CHI; TAI, MING-CHENG; WANG, C.Y; LIU, YUNG-YANG; LI, HSIN-YANG; CHEN, JIANG-TORNG; KAO, SHOU-YEN; CHEN, HEN-LI; LO, WEN-LIANG . Promoting induced pluripotent stem cell-driven biomineralization and periodontal regeneration in rats with maxillary-molar defects using injectable BMP-6 hydrogel. **Scientific Reports**, v. 8, n. 114, 2018.

KAWANE, T., QIN, X., JIANG, Q., MIYAZAKI, T., KOMORI, H., YOSHIDA, C.A., MATSUURA-KAWATA, V.K.D.S., SAKANE, C., MATSUO, Y., NAGAI, K., MAENO, T., DATE, Y. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep.* 8: 13551. **Journal List Scientific Reports**. 2018.

LAUER, A; WOLF, P; MEHLER, D; GÖTZ, H; RÜZGAR, M; BARANOWSKI, A; HENRICH, D; ROMMENS, P.M; RITZ, U. Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences Article**, v. 21. n.6. 2020.

MANOHAR, S;, CAMACHO-MAGALLANES; ECHEVERRIA, JR, C;, CRYSTAL, D.R.. Cadherin-11 Is Required for Neural Crest Specification and Survival. **Frontiers in Physiology**. v.11. 2020.

MARUYAMA, T; STEVENS, R; BOKA, A; DIRIENZO, L; CHANG, C; YU, H.I;

NISHIMORI, K; MORRISON, C; HSU, W. BMPR1A maintains skeletal stem cell properties in craniofacial development and craniosynostosis. **Sci Transl Med**. V. 3, n 13. P. 4416. 2021.

MINUTTI, C.M; MODAK, R.V; MACDONALD, F; LI, F; SMYTH, D.J; DORWARD, D.A; BLAIR, N; HUSOVSKY, C; MUIR, A; GIAMPAZOLIAS, E; DOBIE, R; MAIZELS, R.M; KENDALL, T.J; GRIGGS, D.W; KOPF, M; HENDERSON, N.C; ZAISS, D.M. A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. **Immunity**, v.19, n. 3, p. 645-654. 2019.

SOFIA-NETO, A.S., FERREIRA, J.M.F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**. 2018.

PAKRAVAN, K; RAZMARA, E; MAHMUD HUSSEN, B; SATTARIKIA, F; SADEGHIZADEH, M; BABASHAH, S. SMAD4 contributes to chondrocyte and osteocyte development. **J Cell Mol Med**. V.26. n.1. p 1-15. 2022.

TREMBLAY M, VIALA S, SHAFER ME, GRAHAM-PAQUIN AL, LIU C, BOUCHARD M. Regulation of stem/progenitor cell maintenance by BMP5 in prostate homeostasis and cancer initiation. *Elife*. 2020

VIDOVIC-ZDRILIC, I., Vining, K.H., Vijaykumar, A., Kalajzic, i., Mooney, D.J., Mina, M. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by  $\alpha$ SMA+ Progenitors In Vivo. *Journal List*. **J Dent Res**. 97(10): 1170–1177. 2018.

Wu, V., Helder, M. N., Bravenboer, N., Ten Bruggenkate, C. M., Jin, J., Klein-Nulend, J., & Schulten, E. A. J. M. (2019). Bone Tissue Regeneration in the Oral and Maxillofacial Region: A Review on the Application of Stem Cells and New Strategies to Improve Vascularization. *Stem Cells International*, 2019.

XU, H., DONG, R., ZENG, Q., FANG, L., GE, Q., XIA, C., ZANG, P., NV, S., ZOU, Z., WANG, P., LI, J., RUAN, H., HU, S., WU, C., JIN, H., TONG, P. Col9a2 gene deletion accelerates the degeneration of intervertebral discs. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Volume 23 Issue 3. 2022.

YU, J., XIA, H., NI, Q. A Three-Dimensional Porous Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering, **Journal of Materials Science**, 53 (7): 4734–44. 2018.

ZHAO M, MISHRA L, DENG CX. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. **Int J Biol Sci**, v.14, n. 2, p 111-123. 2018.

## EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS EM PLACAS DE ACRILONITRILA-BUTADIENO-ESTIRENO (ABS M30i)

### Resumo

A restauração de defeitos orofaciais decorrente de lesões, traumas ou doenças impactam positivamente a vida de pacientes que sofreram danos estruturais e funcionais na região da face. A produção de tecidos biológicos por meio da engenharia tecidual tem sido proposta como estratégia auxiliar para cirurgias reconstrutivas orofaciais, sendo necessário a busca por biomateriais compatíveis que levem à formação óssea. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo analisar a assinatura de expressão gênica de células osteoblásticas (SAOS-2) cultivadas em matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional. Para isso, os osteoblastos cultivados em *scaffolds* de acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS M30i) foram avaliados pelo sistema Array Real Time PCR (RT-qPCR) para determinar a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, mineralização óssea, ossificação, fatores de crescimento e fatores de transcrição envolvidos na inflamação e cicatrização. Os resultados do mapa de calor demonstraram um aumento da expressão de grande parte dos genes relacionados a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas, assim como, a expressão dos genes relacionados à produção de colágeno, fatores de crescimento, receptores, fatores de transcrição e alguns outros genes que não pertencem a essas classes. Esses resultados corroboram que os arcaibóios de ABS-M30i, permitem a expressão de grande parte de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, sendo promissora a utilização desse biomaterial na engenharia tecidual.

**Palavras-chave:** osteoblastos, *scaffolds*, engenharia tecidual, acrilonitrila-butadieno-estireno, expressão gênica.

### 6.1 Introdução

Doenças e lesões que afetam a região da boca e da face podem levar à perda da integridade óssea, influenciando, assim, a capacidade de regeneração desse tecido quando associadas a condições sistêmicas desfavoráveis e ao tamanho da lesão. Diante desse cenário, esforços têm sido empreendidos na busca por soluções que possam restaurar o tecido lesado (MINUTTI *et al.*, 2019).

Regularmente, procedimentos como os de transplante ósseo são utilizados para reparar tecidos, no entanto, as restrições ligadas à sua aplicação têm sido amplamente discutidas (BAPTISTA *et al.*, 2018). O advento da engenharia de tecidos junto à fabricação de biomateriais compatíveis surge como uma proposta interessante à restauração de imperfeições na área maxilofacial (SOFIA-NETO; FERREIRA, 2018).

Para obter sucesso na reconstrução de defeitos na região orofacial, é essencial

a ocorrência de interações biomecânicas e biológicas que resultem na formação de novos tecidos, o que torna-se essencial o emprego de biomateriais que, quando combinados com células, assumem a função de uma matriz extracelular temporária. O acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS), que é uma resina termoplástica obtida a partir do petróleo, não apenas exibe biocompatibilidade, mas também demonstra resistência ao impacto e rigidez, sendo amplamente empregado em setores como a indústria farmacêutica e médica (YU *et al.*, 2018).

Para que possam ser empregados como biomateriais, esses polímeros devem favorecer a atuação dos osteoblastos na reconstrução do tecido ósseo. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados à osteogênese em osteoblastos cultivados em polímeros de ABS M30i.

## 6.2 Material e métodos

Este estudo experimental *in vitro* foi realizado com uma linhagem celular disponível comercialmente e, portanto, não necessitou de aprovação de comitê de ética em pesquisa.

As matrizes rígidas foram obtidas por impressão em 3D, utilizando placas de ABS-M30i, as placas de ABS-M30i foram fabricadas na impressora 3D industrial Stratasys Fortus 380 mc, por meio da técnica de manufatura aditiva modelagem por deposição de material fundido (Fused Deposition Modeling - FDM). Microporos de 0,35 mm foram produzidos em arcabouços de 2 mm de espessura e 13 mm de diâmetro externo por uma furadeira automática. O modelo, em forma de disco, possui base sólida.

As células osteoblásticas humanas SAOS-2 (HTB-85™), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), foram plaqueadas nos arcabouços contidos em placas de 24 poços, na densidade de  $2 \times 10^4$  células/arcabouço, e cultivadas em 1 mL de meio McCoy's 5A (Sigma, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil), 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Gibco, Life Technologies, EUA), 100 IU/mL de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 50  $\mu$ g/mL estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar

atmosférico. Essa mesma quantidade de células e meio foi cultivada em um poço de poliestireno, como controle da cultura. Todo o experimento foi feito em triplicata.

### 6.2.1 Extração do RNA e análise da expressão gênica por arranjo RT-qPCR

As reações de PCR quantitativo utilizando a transcriptase reversa foram feitas utilizando-se o sistema QuantStudio™ Design & Analysis Software, no aparelho QuantStudio. Os genes avaliados estão descritos no material suplementar (APÊNDICE A). O grupo de poliestireno foi usado como referencia.

Após o período de 5 e 10 dias de cultivo celular, foi realizada a extração do RNA total com o kit Rneasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (230, 260, 280 e 320 nm).

Posteriormente, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 4 µg de RNA total. Esse procedimento foi feito no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante

### 6.2.2. Análise dos dados

Foi construído um mapa de calor, a fim de fornecer uma representação gráfica do perfil de expressão gênica das moléculas estudadas. Os valores obtidos a partir das células cultivadas com poliestireno foram utilizados como referência.

Os valores de Cq, Delta Cq e fold change foram extraídos para cada gene e as análises foram realizadas pelo método de quantificação relativa pelo cálculo de  $\Delta\Delta Cq$ , sendo o GAPDH utilizado como gene de referência. Além disso, foram comparados os níveis de expressão do fold-change ( $2^{\Delta\Delta Cq}$ ) entre os grupos referência e experimental

## 6.3 Resultados

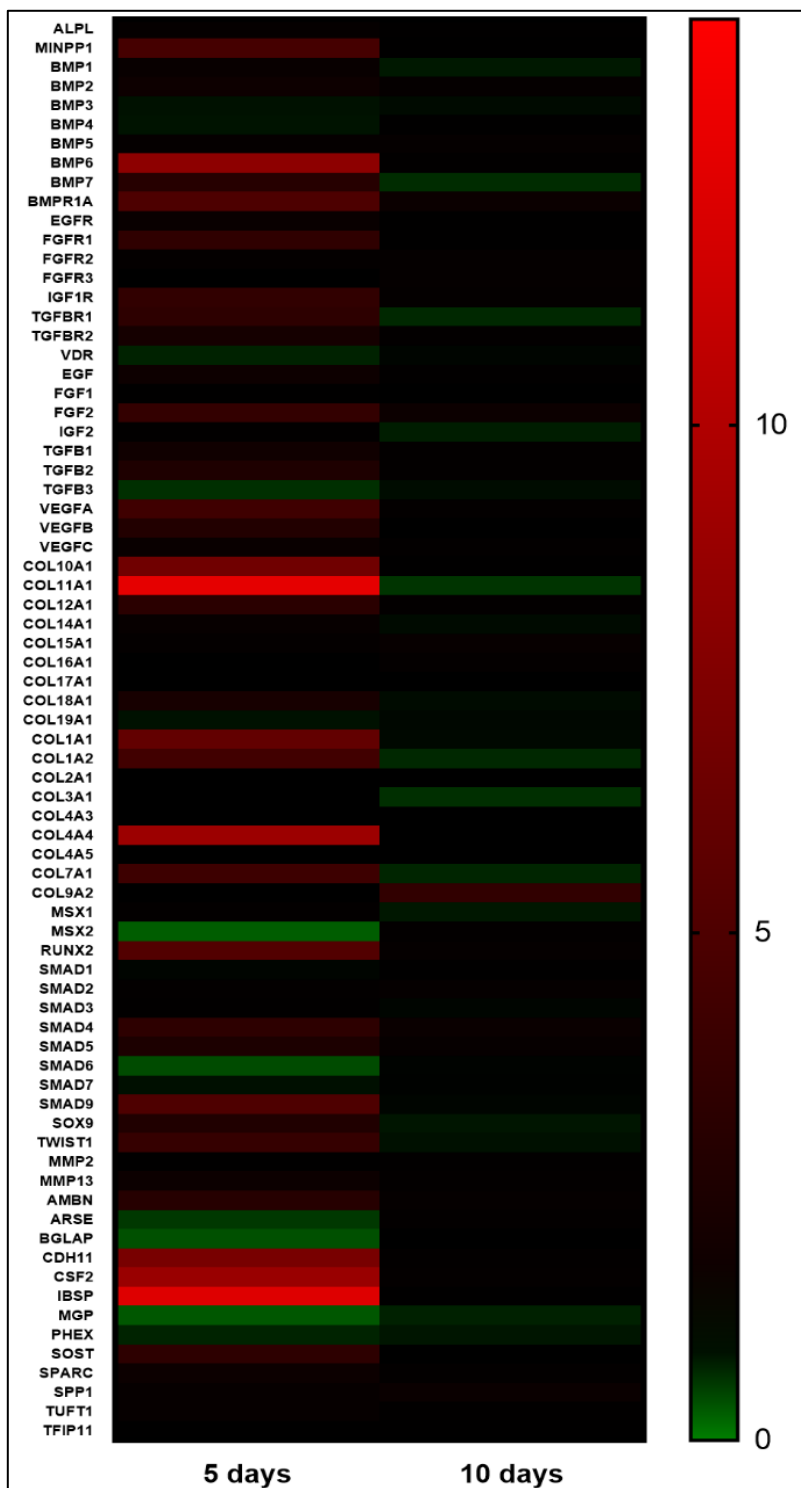
Pela análise do mapa de calor, os genes mais expressos estão na escala próxima ao número 10, representado pela cor vermelha e menos expressos estão na



escala próxima ao número 0, representado pela cor verde (Figura 1), é possível observar um aumento na expressão dos genes analisados com 5 dias de cultivo no arcabouço de ABS-M30i. Para a superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas, o gene BMP6 foi o mais expresso.

A expressão dos genes relacionados à produção de colágeno também foi aumentada, destacando-se o COL11A1. Analisando os genes para as proteínas fatores de crescimento, é possível notar uma maior expressão dos genes VEGFA e FGF2. Na expressão dos genes do grupo de receptores, foi notado um aumento na expressão do BMPR1A (Figura 1).

**Figura 1.** Mapa de calor\* demonstrando a expressão gênica dos osteoblastos cultivados nos arcabouços de ABS M30i após 5 (eixo Y) e 10 dias (eixo X).



Fonte: os autores

Para os genes relacionados a fatores de transcrição, percebe-se que o mais expresso foi o SMAD9. Observa-se, ainda, que os genes RUNX2, SMAD4, SMAD5, SOX9 e TWIST1 também foram expressos. Com relação aos genes diversos, como aqueles que codificam as fosfatase e as metaloproteinases por exemplo, o gene com maior expressão com cinco dias de cultivo foi IBSP. Houve expressão também para

os genes CSF2, CDH11, MINPP1, AMBN, SOST.

A maioria dos genes investigados tiveram baixa expressão nas células cultivadas com o arcabouço de ABS-M30i com 10 dias de cultivo, com exceção para o gene COL9A2, relacionado à produção de colágeno, que teve expressão aumentada.

#### 6.4 Discussão

Os osteoblastos cultivados em ABS-M30i tiveram uma regulação positiva na maioria dos genes estudados, após cinco dias de cultivo. De maneira geral, observou-se uma tendência de queda na expressão gênica com dez dias após o início do cultivo. O conhecimento do comportamento deste tipo celular em biomateriais que possam ser utilizados como arcabouço para a correção de defeitos ósseos é primordial para a aplicação desses referidos biomateriais, porém não foram encontrados estudos que tenham relacionado o ABS-M30i a genes que codificam proteínas envolvidas na formação óssea, como as proteínas morfogenéticas ósseas, fatores de crescimento e fatores de transcrição, demonstrando o caráter inovador do presente estudo.

Nesse estudo foi observado que as BMP mais expressas nas células cultivadas por cinco dias foi a da BMP6. Essas proteínas regulam o desenvolvimento de ossos e cartilagens. A ação da BMP6 é potencializada quando combinada com células-tronco pluripotentes induzidas (CHIEN *et al.*, 2018). As BMP são eficientes em iniciar a neoformação óssea, facilitando os processos de reparo (ALRAEI *et al.*, 2020). Os ligantes dessa família se ligam a vários receptores de TGF-beta levando ao recrutamento e ativação de fatores de transcrição da família SMAD, que atuam na regulação da expressão gênica de fatores relacionados ao metabolismo ósseo. SMAD4, por exemplo, cuja expressão foi elevada nas células com cinco dias de cultivo, tem um papel significativo na regulação da viabilidade de osteoblastos e osteócitos (ZHAO *et al.*, 2018) e no equilíbrio entre atrofia e hipertrofia nas células (PAKRAVAN *et al.*, 2022), controlando assim a homeostase óssea.

Dos genes relacionados às proteínas da família dos colágenos, cruciais nos processos de cicatrização, foi observada uma maior expressão no *col11a1*. A proteína COL11A1 exerce um papel notável na fibrinogênese. Destaca-se também o gene *col9a2*, que manteve regulação positiva aos dez dias. A deleção do gene *col9a2*, cuja proteína é um componente do colágeno primordial da cartilagem hialina, induz e

acelera a progressão da degeneração do disco intervertebral (XU *et al.*, 2022).

Dos genes relacionados a fatores de crescimento, fundamentais para o reparo tecidual, o gene *fgf2*, que codifica para o fator de crescimento FGF2, teve a maior expressão com cinco dias de cultivo, juntamente com o gene que codifica para a VEGFA. O gene *fgf2* exerce importante papel na regulação da sobrevivência, divisão, diferenciação e migração celular, promovendo, inclusive, a diferenciação de odontoblastos. A proteína FGF2 atua como um ligante para TGFB2 e para o receptor FGFR1 (VIDOVIC-ZDRILIC *et al.*, 2018) que também apresentaram regulação positiva aos cinco dias de cultivo.

No grupo dos receptores, o *bmpr1a* foi o mais expresso. O BMPR1A é o principal receptor de BMP tipo I que transduz a sinalização BMP-SMAD durante o desenvolvimento do osso da calvária (MARUYAMA *et al.*, 2021).

Quanto aos genes de fatores de transcrição, destacaram-se *runx2*, *smad5*, *smad9* e *sox9*, primordiais para a diferenciação osteoblástica, morfogênese esquelética e na diferenciação dos condrócitos. O gene *runx2*, além de estar envolvido na proliferação de progenitores de osteoblastos, induz a sua proliferação, parcialmente pela regulação da expressão de *fgf2* e *fgfr3* (KAWANE *et al.*, 2018), genes que não foram expressos no presente experimento. Outros mecanismos de proliferação induzida por *runx2* precisam ser mais bem elucidados. Também houve aumento na expressão do *smad4*, anteriormente mencionado por sua ativação por BMP.

Outros genes também tiveram a sua expressão aumentada, como o da IBSP, proteína não colagena, que modula a atividade das células ósseas e controla a mineralização, o da MINPP1, que atua no processo de ossificação endocondral, o da CDH11, essencial no desenvolvimento e manutenção do osso e na sinalização intracelular (MANOHAR *et al.*, 2020) e o da CSF2, citocina que controla a produção, diferenciação e função de granulócitos e macrófagos.

Este conjunto de informações obtidos a partir da análise de microarranjo permitiu analisar a regulação da rede de genes que desempenham um papel crucial no processo de reparo ósseo. Entretanto, é fundamental exercer cautela na interpretação dos resultados, uma vez que se trata de um estudo *in vitro* realizado utilizando uma linhagem de osteoblastos. Essas descobertas estabelecerão uma base sólida para futuras investigações em modelos animais, a fim de determinar se a regulação observada aqui se manterá durante a produção da matriz óssea.

## 6.5 Conclusão

Os arcabouços de ABS-M30i permitem a expressão de grande parte de genes responsáveis pela formação óssea *in vitro*, sendo promissores para reconstrução óssea.

## Referências

ALRAEI, K; SHARQAWI, J; HARCHER, S; GHITA, I. Efficacy of the Combination of rhBMP-2 with Bone Marrow Aspirate concentrate in Mandibular Defect reconstruction after a Pindborg Tumor Resection. **Case Report in dentistry**, V. 2020. 2020

BAPTISTA, L. S.; KRONEMBERGER, G. S.; CÔRTEZ, I.; CHARELLI, L. E; MATSUI, R. A. M., PALHARES; T. N.; *et al.* Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 5, p.1-14, 2018.

CHAVDA, S., LEVIN, L. Human studies of vertical and horizontal alveolar ridge augmentation comparing different types of bone graft materials: a systematic review. **Journal of Oral Implantology**, v.44, n. 1, 2018.

CHIEEN, K. H., CHANG, Y. L., WANG, M. L., CHUANG, JEN-HUA; YANG, YA-CHI; TAI, MING-CHENG; WANG, C.Y; LIU, YUNG-YANG; LI, HSIN-YANG; CHEN, JIANG-TORNG; KAO, SHOU-YEN; CHEN, HEN-LI; LO, WEN-LIANG . Promoting induced pluripotent stem cell-driven biomineralization and periodontal regeneration in rats with maxillary-molar defects using injectable BMP-6 hydrogel. **Scientific Reports**, v. 8, n. 114, 2018.

KAWANE, T., QIN, X., JIANG, Q., MIYAZAKI, T., KOMORI, H., YOSHIDA, C.A., MATSUURA-KAWATA, V.K.D.S., SAKANE, C., MATSUO, Y., NAGAI, K., MAENO, T., DATE, Y. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Sci Rep.* 8: 13551. **Journal List Scientific Reports**. 2018.

LAUER, A; WOLF, P; MEHLER, D; GÖTZ, H; RÜZGAR, M; BARANOWSKI, A; HENRICH, D; ROMMENS, P.M; RITZ, U. Biofabrication of SDF-1 Functionalized 3D-Printed Cell-Free Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences Article**, v. 21. n.6. 2020.

MANOHAR, S,, CAMACHO-MAGALLANES; ECHEVERRIA, JR, C,, CRYSTAL, D.R.. Cadherin-11 Is Required for Neural Crest Specification and Survival. **Frontiers in Physiology**. v.11. 2020.

MARUYAMA, T; STEVENS, R; BOKA, A; DIRIENZO, L; CHANG, C; YU, H.I; NISHIMORI, K; MORRISON, C; HSU, W. BMP1A maintains skeletal stem cell

properties in craniofacial development and craniosynostosis. **Sci Transl Med.** V. 3, n 13. P. 4416. 2021.

MINUTTI, C.M; MODAK, R.V; MACDONALD, F; LI, F; SMYTH, D.J; DORWARD, D.A; BLAIR, N; HUSOVSKY, C; MUIR, A; GIAMPAZOLIAS, E; DOBIE, R; MAIZELS, R.M; KENDALL, T.J; GRIGGS, D.W; KOPF, M; HENDERSON, N.C; ZAISS, D.M. A Macrophage-Pericyte Axis Directs Tissue Restoration via Amphiregulin-Induced Transforming Growth Factor Beta Activation. **Immunity**, v.19, n. 3, p. 645-654. 2019.

SOFIA-NETO, A.S., FERREIRA, J.M.F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**. 2018.

PAKRAVAN, K; RAZMARA, E; MAHMUD HUSSEN, B; SATTARIKIA, F; SADEGHIZADEH, M; BABASHAH, S. SMAD4 contributes to chondrocyte and osteocyte development. **J Cell Mol Med.** V.26. n.1. p 1-15. 2022.

VIDOVIC-ZDRILIC, I., Vining, K.H., Vijaykumar, A., Kalajzic, i., Mooney, D.J., Mina, M. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by  $\alpha$ SMA+ Progenitors In Vivo. *Journal List.* **J Dent Res.** 97(10): 1170–1177. 2018.

XU, H., DONG, R., ZENG, Q., FANG, L., GE, Q., XIA, C., ZANG, P., NV, S., ZOU, Z., WANG, P., LI, J., RUAN, H., HU, S., WU, C., JIN, H., TONG, P. Col9a2 gene deletion accelerates the degeneration of intervertebral discs. **Experimental and Therapeutic Medicine.** Volume 23 Issue 3. 2022.

YU, J., XIA, H., NI, Q. A Three-Dimensional Porous Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering, **Journal of Materials Science**, 53 (7): 4734–44. 2018.

ZHAO M, MISHRA L, DENG CX. The role of TGF- $\beta$ /SMAD4 signaling in cancer. **Int J Biol Sci**, v.14, n. 2, p 111-123. 2018.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

Os arcabouços de PC-ISO, PLA e ABS-M30i permitem a regulação positiva da expressão de genes envolvidos na formação óssea *in vitro*, com destaque para *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad1*, *runx2*, *bmPr1a* e *Fgfr* no arcabouço PC-ISO. No arcabouço de PLA, destacaram-se os genes *bmp5*, *bmp6*, *col19A1*, *col11A1*, *cfs2*, *spp1*, *minpp1*, *ibsp*, *fgf2*, *tgfb2*, *smad1*, *smad5*, *smad4*, *bmpr1* e *fgr1*, enquanto o maior destaque para o arcabouço de ABS-M30i foi para a expressão gênica de *bmp5*, *bmp6*, *col9A2*, *col11A1*, *spp1*, *lbsp*, *fgf2*, *vegfa*, *smad4*, *smad9*, *runx2* / *bmpr1A*, *fgfr1* e *lgfr1*. Esse aumento da expressão gênica pode ser otimizado nos dias 5 ou no dia 10, a depender do gene expresso.

A utilização dos três biomateriais na engenharia tecidual se mostra promissora para reconstrução óssea. Porém, o PLA parece ter permitido a expressão de forma mais exuberante nos genes que foram destacados, principalmente nas células cultivadas por 10 dias e o PC-ISO permitiu uma resposta global mais uniforme. Esses achados propiciam um direcionamento para a realização de estudos *in vivo* que possam ajudar na compreensão dos biomateriais, especialmente o PLA e o PC-ISO, em sistemas mais complexos.

## REFERÊNCIAS

ALRAEI, K; SHARQAWI, J; HARCHER, S; GHITA, I. Efficacy of the Combination of rhBMP-2 with Bone Marrow Aspirate concentrate in Mandibular Defect reconstruction after a Pindborg Tumor Resection. **Case Report in dentistry**, V. 2020. 2020

ARAÚJO, Mauricio Costa de. **Análise da viabilidade celular e mineralização da matriz extracelular de culturas osteoblásticas crescidas sobre matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional**. 2020. Dissertação (Mestre em Odontologia). Centro de Pós- Graduação/ CPO São Leopoldo Mandic, São Paulo. 2020.

BAPTISTA, L.S., KRONEMBERGER, G.S., CÔRTEZ, I., CHARELLI, L.E, MATSUI, R.A.M., PALHARES, T.N., et al Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. **Int. J. Mol. Sci**,19(5):1–14. 2018.

CHAVDA, S., LEVIN, L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. **Journal of Oral Implantology**. Vol. XLIV. N. One. 2018.

CHIEEN, K.H., CHANG, Y.L., WANG, M.L., et al. Promoting Induced Pluripotent Stem Cell-driven Biomineralization and Periodontal Regeneration in Rats with Maxillary-Molar Defects using Injectable BMP-6 Hydrogel. **Scientific Reports**. 8, 114. 2018.

FUENTES, E.N., PINO, K., NAVARRO, C., DELGADO, I., VALDÉS, J.A., MOLINA, A. Transient inactivation of myostatin induces muscle hypertrophy and overcompensatory growth in zebrafish via inactivation of the SMAD signaling pathway. **J Biotechnol**. 168(4):295–302. 2013.

KAITO, T. et al. BMP-2/7 heterodimer strongly induces bone regeneration in the absence of increased soft tissue inflammation. **The Spine Journal Advancing Global Spine Care- Basic Science**, v. 18, n. 1, p. 139-146, 2018.

KAWANE, T., QIN, X., JIANG, Q., Miyazaki, T., Komori, H., Yoshida, C.A., Matsuura-Kawata, V.K.D.S., Sakane, C., Matsuo, Y., Nagai, K., Maeno, T., DATE, Y. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. **Sci Rep**. 8: 13551. **Journal List Scientific Reports**. 2018.

MEGUID, E.A., KE Y., JI J., EL-HASHASH A.H.K. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. **J Cell Physiol**, v. 9999, p. 1-11. 2017.

MOON, Y.J., YUN, C-Y., CHOI, H., KA, S-O., KIM, J.R., PARK, B-H., CHO, E-S. Smad4 controls bone homeostasis through regulation of osteoblast/osteocyte viability. **Journal list. Exp Mol Med**. Sep; 48(9): e256. 2016.

NETO, A.S., FERREIRA, J.M.F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**. 2018.

ORYAN, A. et al. Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound



with non-negligible side effects and limitations. **Biofactors**, n. 40, v. 5, p. 459-48. 2014.

PAN, H., ZHANG, H., ABRAHAM, P., KOMATSU, Y., LYONS, K., KAARTINEN, V., MISHINA, Y. BmpR1A is a major type 1 BMP receptor for BMP-Smad signaling during skull development. *Journal List. HHS Author Manuscripts. Dev Biol.* Sep 1; 429(1): 260–270. 2017.

SAMMARTINO, G., EHRENFEST, D.M.D., SHIBLI, J.A., GALINDO-MORENO, P. Tissue Engineering and Dental Implantology: Biomaterials, New Technologies, and Stem Cells. **BioMed Research International**. 2016.

SANTOS, Mônica Cristina Galvão. **Avaliação da proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina em células osteoblásticas crescidas sobre matrizes rígidas produzidas com impressora tridimensional**. 2020. Dissertação (Mestre em Odontologia). Centro de Pós- Graduação/ CPO São Leopoldo Mandic, São Paulo. 2020.

VERRIER, S., ALINI, M., ALSBERG, E., BUCHMAN, S.R., KELLY, D., LASCHKE M. W., MENGER, M.D., MURPHY, W.L., STEGEMANN, J.P., SCHÜTZ, M., MICLAU, T., STODDART, M.J., EVANS, C. Tissue engineering and regenerative approaches to improving the healing of large bone defects. **Eur Cell Mater**, v. 32, p. 87-110. 2016.

VIDOVIC-ZDRILIC, I., Vining, K.H., Vijaykumar, A., Kalajzic, i., Mooney, D.J., Mina, M. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by  $\alpha$ SMA+ Progenitors In Vivo. *Journal List. J Dent Res.* 97(10): 1170–1177. 2018.

XU, H., DONG, R., ZENG, Q., FANG, L., GE, Q., XIA, C., ZANG, P., NV, S., ZOU, Z., WANG, P., LI, J., RUAN, H., HU, S., WU, C., JIN, H., TONG, P. Col9a2 gene deletion accelerates the degeneration of intervertebral discs. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Volume 23 Issue 3. 2022

YU, J., XIA, H., NI, Q. A Three-Dimensional Porous Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffold with Shape Memory Effect for Bone Tissue Engineering, **Journal of Materials Science**, 53 (7): 4734–44. 2018.

AITASALO, K.M., PELTOLA, M.J. Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction. **Plast Reconstr Surg.**120(7):1963-72. 2007.

ALAM, F., SHUKLA, V.R., VARADARAJAN, K.M., KUMAR, S. Microarchitected 3D printed polylactic acid (PLA) nanocomposite scaffolds for biomedical applications. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.** [Internet].;103:103576. 2020.

ANTJE GOHLA. Do metabolic HAD phosphatases moonlight as protein phosphatases?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research.* Volume 1866. Issue 1. 2019.

ARDESHIRYLAJIMI, A. Applied Induced Pluripotent Stem Cells in Combination With Biomaterials in Bone Tissue Engineering. **Journal of Cellular Biochemistry**, 118(10), 3034–3042. 2017.

ARK ALEXANDRA VANDER, CAO JINGCHEN, LI XIAOHONG. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. **Cellular Signalling**. Volume 52, Pages 112-120. 2018.

BAPTISTA, L.S., KRONEMBERGER, G.S., CÔRTEZ, I., CHARELLI, L.E., MATSUI, R.A.M., PALHARES, T.N., GRANJEIRO, J.M. Adult stem cells spheroids to optimize cell colonization in scaffolds for cartilage and bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, 19(5), 1–14. 2018.

BERTHIAUME, F., MAGUIRE, T.J., YARMUSH, M.L. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. **Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.** 2(1):403–430. 2011.

CARVALHO, M.S., POUNDARIK, A.A., CABRAL, J.M.S., DA SILVA, C.L., VASHISHTH, D. Biomimetic matrices for rapidly forming mineralized bone tissue based on stem cell-mediated osteogenesis. **Scientific Reports**, 8(1), 1–16. 2018.

CHAVDA, S., LEVIN, L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. **Journal of Oral Implantology**. Vol. XLIV. N. One. 2018.

CHOCHOLATA, P., KULDA, V., BABUSKA, V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. **Materials (Basel)**, Feb 14;12(4):568. 2019.

COZZA N, MONTE F, BONANI W, ASWATH P, MOTTA A, MIGLIARESI C. Bioactivity and mineralization of natural hydroxyapatite from cuttlefish bone and Bioglass® cosintered bioceramics. **J Tissue Eng Regen Med**. Feb;12(2):e1131-e1142, 2018.

CROOK, J.E. M. 3D Bioprinting. **3D Bioprinting**. 2017.

CRUZ, M.A.E., FERREIRA, C.R.F., NOGUEIRA, L.F.B.N., ANDRILHA, L.H.S.A., DOS SANTOS, A.L.N., MACEDO, J.M.M.M., VESCHI, E.A.V., FAVARIN, B.Z.F., SEBINELLI, H.G.S., BOLEAN, M.B., RAMOS, A.P.R., CIANCAGLINI, P.C. Aspectos químicos da biomineralização óssea. **Quim. Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-16, 200. 2022.

CUNHA, J.A., MELLIS, K., SETHI, R., SIAUW, T., SUDHYADHOM, A., GARG, A., *et al.* Evaluation of PC-ISO for customized, 3D Printed, gynecologic 192-Ir HDR brachytherapy applicators. **J Appl Clin Med Phys**. Jan 8;16(1):5168. 2015.

ESPOSITO, M., FELICE, P., WORTHINGTON, H.V. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Issue 5. 2014.

FENG, X., MCDONALD, J.M. Disorders of Bone Remodeling. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, 6, 121–145. 2011.

FERREIRA I, OLIVEIRA I, BORDON K, REIS M, WIEZEL G, SANCHEZ C, SANTOS L, SANTOS-FILHO N, PUCCA M, ANTUNES L, LOPES D, ARANTES E. Beyond Angiogenesis: The Multitasking Approach of the First PEGylated Vascular Endothelial Growth Factor (CdtVEGF) from Brazilian Rattlesnake Venom. **Toxins (Basel)**. Jul 31;15(8):483. 2023.

GAO, L., ZHANG, L., LI, S., WEI, L., LUO, B., HE, R., XIA, S. Role of miR-452-5p in

the tumorigenesis of prostate cancer: A study based on the cancer genome Atl (TCGA), Gene expression, omnibus (GEO), and bioinformatics analysis. **Pathol Res Pract**, v. 17, p. 338 – 344. 2018.

GE, Z., JIN, Z., CAO, T. Manufacture of degradable polymeric scaffolds for bone regeneration. **Biomedical Materials Research**, 23(2):022001, June. 2008.

GERIS, L., *et al.* Angiogenesis in bone fracture healing: A bioregulatory model. **Journal of Theoretical Biology**, v.251, p.137–158, Mar. 2008.

GRABOWSKI, P. Physiology of Bone. Allgrove J, Shaw NJ (eds): Calcium and Bone Disorders in Children and Adolescents. 2nd, revised edition. **Endocr Dev. Basel, Karger**, vol 28, pp 33-55. 2015.

GUILAK, F., BUTLER, D.L., GOLDSTEIN, S.A., BAAIJENS, F.P.T. Biomechanics and mechano biology in functional tissue engineering. **Journal of Biomechanics**. 2014.

GÓMEZ-GRAS G, ABAD MD, PÉREZ MA. Mechanical Performance of 3D-Printed Biocompatible Polycarbonate for Biomechanical Applications. **Polymers**. 13(21):3669. 2021

HAGGERTY, J.C., VOGEL, C.T., FISCHER, J.R. Simple Bone Augmentation for Alveolar Ridge Defects. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of N Am** 27 (2): 203–26. 2015.

HAUGEN, H. J., LYGSTADAAS, S. P., ROSSI, F. Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. **Journal of Clinical Periodontology**, v.46, p. 92-102. 2019.

HUANG, Y., ZHANG, X. F., GAO, G., YONEZAWA, T., CUI, X. 3D bioprinting and the current applications in tissue engineering. **Biotechnology Journal**, 12(8). 2017.

IRVINE, S.A., VENKATRAMAN, S.S. Bioprinting and differentiation of stem cells. **Molecules**, 21(9). 2016.

JIABING FAN, XIAO ZHANG, MINJEE KANG, CHUNG-SUNG LEE, LAUREN KIM, DANNY HADAYA, TARA L. AGHALOO, MIN LEE. Complementary modulation of BMP signaling improves bone healing efficiency. **Biomaterials**. Volume 302. 2023.

LASTAYO, P.C., WINTERS, K.M., HARDY, M. Fracture healing: Bone healing, fracture management, and current concepts related to the hand. **Journal of Hand Therapy**, 16(2), 81–93. 2003.

MA, TT., MENG, XM. TGF- $\beta$ /Smad and Renal Fibrosis. In: Liu, BC., Lan, HY., Lv, LL. (eds) Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. vol 1165. Springer, Singapore. 2019.

MARIE PJ. Osteoblast dysfunctions in bone diseases: from cellular and molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Cell Mol Life Sci**. Apr;72(7):1347-61. 2015.

MARTIN, V., RIBEIRO, I.A., ALVES, M.M., GONÇALVES, L., CLAUDIO, R.A.,

GRENHO, L., BETTENCOURT, A.F. Engineering a multifunctional 3D-printed PLA-collagen-minocyclinenanoHydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, 101(February), 15–26. 2019.

Maruyama Masahiro, Rhee Claire, Utsunomiya Takeshi, Zhang Ning, Masaya, Ueno Zhenyu Yao, Goodman Stuart B. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Frontiers in Endocrinology*. June 2020 | Volume 11 | Article 386. 2020.

MERAZZO KJ, DÍEZ AG, TUBIO CR, MANCHADO JC, MALET R, PÉREZ M, COSTA P, LANCEROS-MENDEZ S. Acrylonitrile Butadiene Styrene-Based Composites with Permalloy with Tailored Magnetic Response. **Polymers**. 15(3):626. 2023.

MURSHED, M. Mechanism of Bone Mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. 2018.

NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J.M., BEHRINGER, R.R., *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**; 108:17–29. 2002.

NETO, A.S., FERREIRA, J.M.F. Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. **Materials**. 2018.

NGO, T.D., KASHANI, A., IMBALZANO, G., NGUYEN, K.T.Q., HUI, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. **Composites Part B: Engineering**, 143 (December 2017), 172–196. 2018.

ONG, C.S., YESANTHARAO, P., HUANG, C.Y., MATTSON, G., BOKTOR, J., FUKUNISHI, T., HIBINO, N. 3D bioprinting using stem cells. **Pediatric Research**, 83(1–2), 223–231. 2018.

ORYAN, A. *et al.* Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. **Biofactors**, n. 40, v. 5, p. 459-481. 2014.

ORYAN, A., MONAZZAH, S., BIGHAM-SADEGH, A. Bone injury and fracture healing biology. **Biomedical and Environmental Sciences**, 28(1), 57–71. 2015.

PARITHIMARKALAINAN, S., PADMANABHAN, T.V. Osseointegration: An Update. **J Indian Prosthodont Soc**. 13(1):2–6. 2013.

PASSOS M, ZANKOVIC S, MINAS G, KLÜVER E, BALTZER M, SCHMAL H, SEIDENSTUECKER M. About 3D Printability of Thermoplastic Collagen for Biomedical Applications. **Bioengineering**. 9(12):780. 2022

PRAFULLA K. CHANDRA, SHAY SOKER, ANTHONY ATALA. Chapter 1 - Tissue engineering: current status and future perspectives, Editor(s): Robert Lanza, Robert Langer, Joseph P. Vacanti, Anthony Atala, **Principles of Tissue Engineering** (Fifth Edition), Academic Press, Pages 1-35. 2020.

QIN, K., DONG, C., WU, G., LAMBERT, N.A. Inactive-state preassembly of Gq-coupled receptors and Gq heterotrimers. **Nat. Chem. Biol.**, 7(10), 740-747. 2011.

RAMAKRISHNA, S., MAYER, J., WINTERMANTEL, E., LEONG, K.W. Biomedical of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and technology**. 61. 1189-1224. 2001.

REECE, J.B., URRY, L.A., CAIN, M.L., WASSERMAN, S.A., MINORSKY, P.V., JACKSON, R.B. Combinatorial control of gene activation. **Em Campbell Biology** (10th ed., pp. 37). San Francisco, CA: Pearson. 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica – texto e atlas**. 13<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2017.

ROSENZWEIG, D.H., CARELLI, E., STEFFEN, T., JARZEM, P. **Impresso-3D ABS e PLA andaimes para a cartilagem e núcleo pulposo Regeneração Tecidual**, 15118–15135. 2015.

SANTOS-BEATO P, MIDHA S, PITSILLIDES AA, MILLER A, TORII R, KALASKAR DM. Biofabrication of the osteochondral unit and its applications: Current and future directions for 3D bioprinting. **Journal of Tissue Engineering**. 2022.

SENGUPTA, M., BANERJEE, P., PAUL, S., SENGUPTA, J., GHOSH, M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. **Muller J Med Sci Res**.6:27-30. 2015.

SIMÕES G, PEREIRA T, CASEIRO A. Matrix metalloproteinases in vascular pathology. **Microvasc Res**. Sep;143:104398. 2022.

SORUSHANOVA A, DELGADO LM, WU Z, SHOLOGU N, KSHIRSAGAR A, RAGHUNATH R, MULLEN AM, BAYON Y, PANDIT A, RAGHUNATH M, ZEUGOLIS DI. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. **Adv Mater**. Jan;31(1):e1801651. 2019.

LIMA, S.H.C., CHEIM, J.A.P., MORENO, R., DE MIRANDA, S.L. Off-label use of rhBMP-2 as bone regeneration strategies in mandibular ameloblastoma unicystic. **Einstein (Sao Paulo)**. Jan-Mar;15(1):92-95. 2017.

TAGUCHI, K., OGAWA, R., MIGITA, M., HANAWA, H., ITO, H., ORIMO, H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 331, 31–36. 2005.

TRESGUERRES FGF, TORRES J, LÓPEZ-QUILES J, HERNÁNDEZ G, VEGA JA, TRESGUERRES IF. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. **Ann Anat**. Jul;230:151510. 2020.

URBAN, I. A, Monje, A. Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. **Oral and maxillofacial surgery clinics of North America**, v. 31,n. 2, p. 331-338. 2019

VELOSA, A.P.P., TEODORO, W.R., NATALINO, H.Y. Collagen in osteoarthrotic cartilage. **Rev. Bras. Reumatol.** 43 (3), Jun. 2003.

ROSS, M.H; PAWLINA, W. **Histologia – Texto e Atlas.** 7º ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogam. 2018.

YIFAN HUANG, PENG GAO, TAO QIN, BO CHU, TAO XU, JIANG YI, QIAN WANG, ZHENQI YANG, TAO JIANG, JIN FAN, SHUJIE ZHAO, WEI ZHOU, JIAN CHEN, GUOYONG YIN. Delayed inhibition of collagen deposition by targeting bone morphogenetic protein 1 promotes recovery after spinal cord injury. **Matrix Biology.** Volume 118. 2023.

YUCEL, T. Matrix metalloproteinase expression in basal cell carcinoma: relationship between enzyme profile and collagen fragmentation pattern. **Exp Mol Pathol**, v. 79, n. 2, p. 151-60. 2005.

WANG, L., YOU, X., ZHANG, L, CHANGQING ZHANG E WEIGUO ZOU. Mechanical regulation of bone remodeling. **Bone Research.** 10, 16. 2022.

ZUBAIR M, AHMAD J. Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review. **Rev Endocr Metab Disord.** Jun;20(2):207-217. 2019.

ZAMBUZZI, W.F., NEVES, M.C.M., OLIVEIRA, R.C., SILVA, T.L., CESTARI, T.M., BUZALAF, M.A.R., GRANJEIRO, J.M., TAGA, R., TAGA, E.M. Tissue reaction and phosphatases profile after implant of xenogenic demineralized bone matrix in rat muscle. **Cienc Odontol Bra.** abr./jun.; 8 (2): 90-98. 2005.

ZHOU, X., FENG, Y., ZHANG, J., SHI, Y., WANG, L. Recent advances in additive manufacturing technology for bone tissue engineering scaffolds. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology.* **Springer**, June1. 2020.

## APÊNDICE A - Material suplementar

**Tabela 1.** Descrição dos genes analisados por arranjo RT-qPCR.

FAMÍLIA	SÍMBOLO	DESCRIÇÃO
Fosfatase	ALPL	Fosfatase alcalina, fígado/osso/rim
	MINPP1	Múltiplo inositol polifosfato fosfatase 1
Superfamília das proteínas morfogenéticas ósseas	BMP1	Proteína morfogenética óssea 1
	BMP2	Proteína morfogenética óssea 2
	BMP3	Proteína morfogenética óssea 3
	BMP4	Proteína morfogenética óssea 4

	BMP5	Proteína morfogenética óssea 5
	BMP6	Proteína morfogenética óssea 6
	BMP7	Proteína morfogenética óssea 7
Receptores	BMPR1A	Receptor de proteína morfogenética óssea, tipo IA
	EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
	FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
	FGFR2	Receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos
	FGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
	IGF1R	Receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina
	TGFBR1	Receptor TGF-beta tipo 1
	TGFBR2	Receptor TGF-beta tipo 2
	VDR	Receptor de vitamina D
Fatores de crescimento	EGF	Fator de crescimento epidérmico
	FGF1	Fator de crescimento de fibroblastos 1
	FGF2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
	IGF2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
	TGFB1	Fator de crescimento transformador, beta 1
	TGFB2	Fator de crescimento transformador, beta 2
	TGFB3	Fator de crescimento transformador, beta 3
	VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
	VEGFB	Fator de crescimento endotelial vascular B
	VEGFC	Fator de crescimento endotelial vascular C
Colágenos	COL10A1	Colágeno, tipo X, alfa 1
	COL11A1	Colágeno, tipo XI, alfa 1
	COL12A1	Colágeno, tipo XII, alfa 1
	COL14A1	Colágeno, tipo XIV, alfa 1
	COL15A1	Colágeno, tipo XV, alfa 1
	COL16A1	Colágeno, tipo XVI, alfa 1
	COL17A1	Colágeno, tipo XVII, alfa 1
	COL18A1	Colágeno, tipo XVIII, alfa 1
	COL19A1	Colágeno, tipo XIX, alfa 1
	COL1A1	Colágeno, tipo I, alfa 1
	COL1A2	Colágeno, tipo I, alfa 2
	COL2A1	Colágeno, tipo II, alfa 1
	COL3A1	Colágeno, tipo III, alfa 1
	COL4A3	Colágeno, tipo IV, alfa 3
	COL4A4	Colágeno, tipo IV, alfa 4
	COL4A5	Colágeno, tipo IV, alfa 5
	COL7A1	Colágeno, tipo VII, alfa 1
	COL9A2	Colágeno, tipo IX, alfa 2
Fatores de transcrição	MSX1	Proteína Homeobox MSX-1
	MSX2	Proteína Homeobox MSX-2
	RUNX2	Fator de transcrição 2 relacionado a runt
	SMAD1	Membro da família SMAD 1
	SMAD2	Membro da família SMAD 2
	SMAD3	Membro da família SMAD 3
	SMAD4	Membro da família SMAD 4
	SMAD5	Membro da família SMAD 5
	SMAD6	Membro da família SMAD 6
	SMAD7	Membro da família SMAD 7
	SMAD8	Membro da família SMAD 8
SMAD9	Membro da família SMAD 9	
	SOX9	Fator de transcrição SOX-9
	TWIST1	Proteína 1 relacionada à torção
Metaloproteinase	MMP2	Metaloproteinase de matriz 2
	MMP13	Metaloproteinase de matriz 13
Outros genes	AMBN	Ameloblastina
	ARSE	Arilsulfatase
	BGLAP	Osteocalcina
	CDH11	Caderina 11
	CSF2	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos
	IBSP	Sialoproteína óssea
	MGP	Proteína Matrix Gla
	PHEX	Endopeptidase neutra reguladora de fosfato
	SOST	Esclerostina
	SPARC	Proteína secretada ácida e rica em cisteína

---

SPP1	Fosfoproteína 1 secretada
TUFT1	Tuftelina
TFIP11	Proteína 11 que interage com a tuftelina

---